



Rosa Ema Wilenmann Serrano

**ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO
COMPARADO DA PELE, DAS GLÂNDULAS CUTÂNEAS E DAS
GLÂNDULAS CUTÂNEAS SEXUALMENTE DIMÓRFICAS DE TRÊS
ESPÉCIES DE ANFÍBIOS ANUROS**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Rosa Ema Wilenmann Serrano e aprovada pela Comissão Julgadora.

20/02/98 *[Handwritten signature]*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia UNICAMP, para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, na área de Morfologia.

Orientadora: Profa. Dra. Iara Maria Silva De Luca

Campinas - SP

1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Se 68e
V	EA
T.M.	34153
P.V.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
F	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/06/98
N.º CPD	

CM-00112889-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Serrano, Rosa Ema Wilenmann

Se68e Estudo histológico, histoquímico e morfométrico comparado da pele, das glândulas cutâneas e das glândulas cutâneas sexualmente dimórficas de três espécies de anfíbios anuros / Rosa Ema Wilenmann Serrano. -- Campinas, SP: [s.n.],1998.
81f.: ilus.

Orientadora: Iara Maria Silva De Luca
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Anfíbios. 2. Anuros. 3. Pele. I. De Luca, Iara Maria Silva.
II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia.
III. Título.

Defesa de tese realizada no dia 19/02/98.

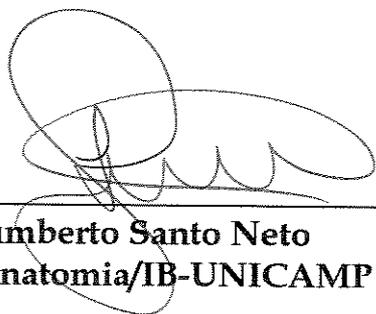
Banca Examinadora



Profa. Dra. Iara Maria Silva De Luca (Orientadora)
Depto. de Histologia/IB-UNICAMP



Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis
Depto. de Histologia/IB-UNICAMP



Prof. Dr. Humberto Santo Neto
Depto. de Anatomia/IB-UNICAMP

Profa. Dra. Ivanira José Bechara
Depto. de Histologia/IB-UNICAMP

Esta dissertação é dedicada "in memoriam" ao Professor Adão José Cardoso, cientista, zoólogo, amigo saudoso e grande incentivador não só deste trabalho como também de muitos outros.

O que você faz

é uma gota no oceano;

porém é isso que dá

sentido à sua vida.

(Schweitzer)

A mis queridos padres, Juan Enrique y Yolanda y a mi hermano Juan, por el cariño e incentivo constantes. Por todo lo que yo soy, por el ejemplo de lucha y perseverancia.

O meu agradecimento especial:

À Profa. Dra. Iara Maria Silva De Luca, orientadora desta tese, pela oportunidade e valiosa ajuda para torná-la realidade. Sou grata, também, pela orientação precisa, pelo exemplo de profissionalismo e dignidade, pelo estímulo e dedicação com que acompanhou a execução da mesma em todas as suas etapas.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da Pré-banca: Profa.Dra. *Ivanira José Bechara*, Prof.Dr. *Norair Salviano dos Reis* e Prof.Dr. *Humberto Santo Neto*, pelas sugestões críticas e correções importantes para a finalização da tese.

À Profa. Dra. *Maria Alice C. Höfling* pelo apoio e estímulo.

Aos professores e ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Morfologia pela contribuição à minha formação científica.

Ao doutorando *Ariovaldo Antonio Giaretta* do Depto. de Zoologia do IB-Unicamp pela valiosa colaboração durante a coleta das espécies, para o desenvolvimento deste trabalho.

A *Gláucia Monteiro de Castro*, (Pós-graduanda em Biologia Celular), amiga de todas as horas a quem devo o equilíbrio necessário para passar horas diante do micro, e o valioso auxílio na confecção dos gráficos e acabamento final da tese.

A *Dorothy Mesquita Dourado* (Pós-graduanda em Morfologia) e *Valéria Franceschinelli* (ex-aluna da Unicamp), amigas especiais que com sua amizade permitiram-me superar os momentos de dificuldade.

Aos meus amigos da Pós-graduação: *Adrienne*, *Carmem Lúcia*, *Celina*, *Cristiane*, *Júlio, Junior*, *Luciana*, *Luzdalma*, *Mônica*, *Patrícia Aline* e *Patrícia Dourado*, pela excelente convivência que tivemos.

A *Marta Beatriz Leonardo* pela sua atenção e pelo auxílio objetivo prestado na execução do trabalho.

Às amigas e funcionárias *Marta Almeida* e *Raquel Prata Vieira*, e aos técnicos *Cleusa de Oliveira Franco*, *Baltazar Pereira de Paula* e *Thelma Cristina Marsariolli* pela valiosa amizade e auxílio técnico.

Às secretárias *Helena*, *Rita* e *Vânia*, do Departamento de Histologia e Embriologia, do Instituto de Biologia/UNICAMP, em momentos de necessidade, pela colaboração sempre espontânea.

Ao CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico pelo auxílio financeiro, necessário para a realização deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação na pessoa do Prof. Dr. *Áureo Tatsumi Yamada*.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização desta tese.

ÍNDICE

RESUMO.....	8
1 — INTRODUÇÃO.....	9
2 — MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 MATERIAL UTILIZADO.....	12
2.2 MÉTODOS HISTOLÓGICOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS	14
2.2.1 Procedimentos gerais para microscopia de luz.....	14
2.2.2 Avaliação histológica morfométrica	15
2.2.3 Análise histoquímica.....	15
2.3 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	17
3 — RESULTADOS.....	18
3.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA QUALITATIVA.....	18
3.1.1 Pele dorsal.....	18
3.1.2 Pele ventral.....	20
3.1.3 Glândula Cutânea Sexualmente Dimórfica	20
3.1.4 <i>Cycloramphus dubius</i>	21
3.1.5 <i>Scinax hiemalis</i>	22
3.1.6 <i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	23
3.2 ANÁLISE HISTOQUÍMICA	23
3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA QUANTITATIVA.....	26
3.3.1 <i>Cycloramphus dubius</i>	26
3.3.2 <i>Scinax hiemalis</i>	26
3.3.3 <i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	27
4 — DISCUSSÃO.....	28
5 — CONCLUSÕES	40
6 — FOTOMICROGRAFIAS.....	42
7 — TABELAS E GRÁFICOS.....	60
ABSTRACT.....	75
8 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

RESUMO

Neste trabalho procedeu-se a um estudo comparado em nível histológico, histoquímico e morfométrico da pele, das glândulas cutâneas e das glândulas cutâneas sexualmente dimórficas (GCSD) de três espécies de anfíbios anuros: *Cycloramphus dubius*, *Scinax hiemalis* e *Phyllomedusa burmeisteri* — a primeira pertencente à família *Leptodactylidae* e as duas últimas à família *Hylidae*.

O foco deste trabalho esteve centrado nas glândulas cutâneas sexualmente dimórficas com o intuito de estabelecer não só as similaridades existentes entre as glândulas das espécies estudadas, bem como discutir o provável papel desempenhado por esse tipo de glândula — uma vez que as mesmas constituem característica sexual secundária de machos adultos.

A análise dos resultados veio mostrar que a pele e as glândulas cutâneas das três espécies estudadas possuem um padrão estrutural comum, apresentando, no entanto, pequenas variações relacionadas principalmente com o habitat ecológico e os hábitos do animal.

As glândulas cutâneas sexualmente dimórficas exibidas pelos machos adultos das três espécies apresentam morfologia e perfil histoquímico muito semelhante, embora possuam localização anatômica diferente: inguinal (para *C. dubius*), ventro-sacral (para *S. hiemalis*) e nos polegares (para *P. burmeisteri*); elas são constituídas principalmente por adenômeros granuloso alongados, agrupados compactamente e recobertos por epiderme delgada.

Dessas três glândulas, só a glândula nupcial de *Phyllomedusa burmeisteri* pode ser considerada como uma "breeding gland" propriamente dita; as outras duas necessitam ser submetidas a novos estudos para que possam ser enquadradas nessa denominação. No entanto, as observações de campo realizadas para a espécie *Cycloramphus dubius*, acopladas à morfologia exibida pelas glândulas inguinais à época reprodutiva, sugerem fortemente que essas glândulas estejam relacionadas com o comportamento reprodutivo desse animal.

Palavras-chave: pele, glândulas cutâneas sexualmente dimórficas, histologia, histoquímica, anfíbios.

1 — INTRODUÇÃO

Embora o tegumento dos anfíbios anuros possua uma organização estrutural básica, cada espécie pode apresentar características particulares, refletindo adaptações anatômicas correlacionáveis com diferentes habitats ecológicos (BANI et al., 1985; CLARKE, 1997).

De modo geral, o tegumento dos anuros é constituído por duas camadas distintas, o epitélio superficial (epiderme) e o conjuntivo subjacente (derme) que contém dois tipos de glândulas multicelulares — mucosas e granulosas (DUELLMAN & TRUEB, 1986). As glândulas mucosas distribuem-se de modo uniforme pelo corpo e estão, frequentemente, associadas com o controle do pH e do grau de umidade da pele, facilitando, assim, a termorregulação, a osmorregulação e a respiração cutânea (DAPSON, 1969; LILLYWHITE & LICHT, 1975; BUENO et al., 1981). As glândulas granulosas (serosas), apresentam distribuição menos regular e têm sido correlacionadas com a defesa passiva dos anuros contra predadores, uma vez que secretam substâncias que podem ser potencialmente tóxicas para várias espécies de vertebrados (DAPSON et al., 1973; BRODIE & TUMBARELLO, 1978; DALY et al., 1978; GARTON & MUSHINSKY, 1979; TOLEDO & JARED, 1995). Um terceiro tipo de glândula foi descrito por BLAYLOCK et al. (1976) na pele dos *Phyllomedusinae*. Esse tipo de glândula secreta lípidos que estão relacionados com a diminuição da evaporação cutânea. Além disso, em muitas espécies, as glândulas mucosas ou as granulosas podem agrupar-se formando protuberâncias macroscopicamente visíveis (HOSTETLER & CANNON, 1974; CANNON & HOSTETLER, 1976; FUJIKURA et al., 1988; TOLEDO & JARED, 1989). Muitos desses agregados glandulares aparecem somente nos machos em resposta aos hormônios testiculares. Em virtude de sua dependência hormonal, essas estruturas

glandulares mostram-se visíveis apenas na época reprodutiva ou, então, exibem desenvolvimento máximo nesse período (NOBLE, 1955; DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Esses acúmulos glandulares especiais exibidos pelo macho, principalmente à época reprodutiva, estão localizados, com frequência, na região do polegar e do antebraço e denominam-se coxins nupciais (*nuptial pads*), mas podem ocorrer em qualquer outra área do corpo. Usualmente, têm sido feitas distinções entre as glândulas cutâneas sexualmente dimórficas (GCSD) encontradas nos coxins nupciais (designadas glândulas nupciais) e aquelas presentes em acúmulos de outras áreas do corpo do animal.

Recentemente, THOMAS et al. (1993b) estudaram comparativamente as GCSD de 14 espécies representativas de seis famílias de anuros. Esse estudo mostrou que essas glândulas são histoquimicamente diferentes das outras glândulas cutâneas dos anuros (mucosas e serosas) mas, histologicamente, podem assemelhar-se tanto às mucosas como às serosas; na maioria das vezes, porém, são mais semelhantes às glândulas mucosas. Com base nesses resultados, esses autores sugeriram, então, que as GCSD partilham características estruturais e químicas em comum, podendo, por essa razão, representar um novo tipo de glândula. Para esses autores o termo *breeding gland* deveria ser redefinido de maneira mais ampla com o intuito de abranger qualquer glândula cutânea sexualmente dimórfica que seja estrutural e histoquimicamente semelhante às glândulas nupciais, independentemente da localização física da glândula em questão.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar, comparativamente, em nível histológico, histoquímico e morfométrico, o tegumento, as glândulas cutâneas e as

glândulas cutâneas sexualmente dimórficas de três espécies de anfíbios anuros pertencentes às famílias *Hylidae* e *Leptodactylidae*.

O foco principal do nosso trabalho esteve centrado nas glândulas cutâneas sexualmente dimórficas com o intuito de:

- 1º) Caracterizar essas glândulas do ponto de vista estrutural e histoquímico;
- 2º) Demonstrar como essas glândulas diferem das outras glândulas presentes na pele (mucosas e granulosas);
- 3º) Examinar as similaridades dessas glândulas entre as espécies estudadas neste trabalho;
- 4º) Discutir o provável papel desempenhado por esse tipo de glândula em cada uma das três espécies abordadas.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem metodológica permitiu a avaliação dos seguintes parâmetros qualitativos e quantitativos:

1) Detecção de proteínas, carboidratos e substâncias lipídicas ,com a finalidade de estabelecer um perfil histoquímico para a pele e as diferentes glândulas cutâneas;

2) Espessura da pele das regiões dorsal e ventral e do local da glândula sexualmente dimórfica;

3) Espessura da epiderme e da derme das regiões dorsal e ventral e do local da glândula sexualmente dimórfica;

4) Diâmetro dos corpos glandulares (porção secretora) das glândulas mucosas, granulosas, lipídicas e daqueles presentes na glândula sexualmente dimórfica;

Estes parâmetros quantitativos são de suma importância na caracterização das glândulas cutâneas sexualmente dimórficas, uma vez que essas glândulas podem variar morfometricamente com o estado hormonal (época reprodutiva) do animal.

2.1 *Material utilizado*

Para o estudo proposto, foram utilizados espécimes adultos, machos e fêmeas das espécies *Phyllomedusa burmeisteri*, *Scinax hiemalis* e *Cycloramphus dubius*, coletados na região de Itatiba, no Parque Florestal do Itapetinga (Atibaia) e na região de Cubatão, respectivamente.

1) *Phyllomedusa burmeisteri*, hilídeo com cerca de 5-6 cm de comprimento, que vive perto de pequenas poças de água, às margens de mata secundária, mas que faz incursões às árvores. Esta espécie possui glândulas lipídicas e os machos apresentam, na época reprodutiva, glândulas nupciais localizadas nos polegares (*nuptial pads*).

2) *Scinax hiemalis*, hilídeo de diminutas dimensões (1-2 cm de comprimento) que habita as margens de riachos no interior da mata. Esta espécie não apresenta glândulas lipídicas tegumentares e os machos exibem um acúmulo de glândulas na região ventro-sacral, pouco visível em nível macroscópico e identificada histologicamente por nós.

3) *Cycloramphus dubius*, leptodactilídeo medindo cerca de 5 cm de comprimento e que vive nas vizinhanças de pequenas quedas d'água, na região costeira da Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Os machos desta espécie possuem um par de protuberâncias na região ílio-sacral, denominadas "glândulas inguinais" pelos taxonomistas. Estas glândulas foram, recentemente, descritas histologicamente por nós, restando, no entanto, determinar a natureza histoquímica de sua secreção, bem como seu exato papel funcional.

Para cada uma das três espécies a ser estudadas, "voucher" espécimes estão guardados no Museu de História Natural da Universidade de Campinas.

As espécies citadas foram coletadas durante a época reprodutiva e fora desse período.

Da espécie *Cycloramphus dubius* foram coletados machos adultos (com e sem prole), machos jovens e fêmeas. Os espécimes empregados efetivamente (para

obtenção dos dados histológicos, histoquímicos e morfométricos), somaram um total de nove animais, seis machos e três fêmeas. Para *Scinax hiemalis* utilizaram-se seis animais (três machos e três fêmeas); para *Phyllomedusa burmeisteri* usou-se um exemplar macho adulto e três fêmeas; para obtenção de dados sobre o coxín nupcial, foram utilizados, ainda, dois machos adultos provenientes da coleção do Museu de História Natural da Universidade de Campinas.

2.2 Métodos histológicos qualitativos e quantitativos

2.2.1 Procedimentos gerais para microscopia de luz

No laboratório, imediatamente antes do sacrifício, os animais foram colocados na geladeira por um período variável de tempo, até tornarem-se não responsivos à manipulação (cerca de 10 a 15 minutos), sendo, a seguir, decapitados. Após o sacrifício, fragmentos da pele das regiões dorsal e ventral e as macroglândulas foram retirados, estendidos sobre papel de filtro e, finalmente, colocados em solução de Bouin por 24 horas. Depois da fixação, os fragmentos foram processados de acordo com métodos rotineiros e incluídos em parafina. Os cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram submetidos a coloração pelo hemalume-eosina e pelo tricrômico de Masson (MICHALANY, 1980).

A montagem dos cortes em cada lâmina foi feita da seguinte maneira: escolheu-se o 1º corte da fita de parafina, os 5 cortes subsequentes foram desprezados e o 7º foi montado — e assim sucessivamente, até serem obtidos 5 cortes por lâmina. O objetivo desta montagem foi o de conseguirem-se imagens microscópicas diferentes entre si para as avaliações morfométricas.

Os fragmentos de pele e as macroglândulas destinadas ao estudo de substâncias lipídicas foram fixados em formalina-cálcio. Após fixação, foram cortados em criótomo, com 10-20 μm de espessura. Os cortes histológicos foram conservados na solução fixadora até o momento do uso.

2.2.2 Avaliação histológica morfométrica

A espessura da pele, da epiderme e da derme das regiões dorsal e ventral e do sítio da macroglândula foram avaliados nos cortes histológicos com o auxílio de uma ocular de tambor 10x com filamento deslocável. Com o auxílio dessa ocular foi, também, efetuada a medição dos diâmetros dos corpos glandulares (porção secretora) dos diferentes tipos de glândulas presentes nas regiões citadas.

Após a medição dessas estruturas, procedeu-se a calibração da ocular com uma lâmina especial, provida de divisões de 0,01 mm (10 μm), visando transformar as unidades da ocular em micrômetros.

2.2.3 Análise histoquímica

Uma variedade de testes histoquímicos padronizados foram usados para detectar proteínas, mucossubstâncias* e lípides.

1) Proteínas — ninhidrina-Schiff (PEARSE, 1961) e Picrossirius-hematoxilina (JUNQUEIRA et al., 1979);

2) Mucossubstâncias — Ácido periódico-Schiff (PAS; HUMASON, 1962) e Alcian-blue em pH 0,5 e pH 2,5 (AB; BANCROFT & STEVENS, 1990);

3) Lípides - Sudan black B (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983);

* Observação: Convencionou-se considerar aqui o termo mucossustância ao invés de termos ambíguos tais como: mucina, mucóide, mucopolissacarídeo, mucoproteína, sulfomucina, sialomucina e vários outros. Assim, por definição, as mucossustâncias são compostos macromoleculares constituídos inteiramente ou em parte por carboidratos, englobando, portanto, polissacarídeos, glicoproteínas e proteoglicanas.

Por outro lado, o termo "açúcar neutro" usado neste trabalho, embora não seja adequado no sentido estritamente químico, é utilizado pelos histoquímicos para resíduos de monossacarídeos que não possuem grupos ácidos (que podem ser carboxilas ou grupamentos sulfatos). Glicose, galactose, manose e fucose são os principais açúcares neutros presentes nas mucossustâncias.

Além disso, como se sabe a oxidação pelo ácido periódico usado na reação do PAS produz aldeídos a partir de radicais vic-glicóis presentes na glicose, galactose, manose, fucose e no ácido siálico, que podem estar fazendo parte da molécula do glicogênio (caso da glicose) e das glicoproteínas. Assim, para afastar-se a possibilidade de que a PAS positividade fosse devida ao glicogênio, lâminas-controle foram previamente incubadas com amilase (KIERNAN, 1991) antes da realização da reação do PAS.

No caso das mucossustâncias ácidas foram utilizados, quando necessário, os bloqueios específicos para diferenciar os radicais carboxilados dos sulfatados—metilação + saponificação + Alcian-blue pH 2,5 (SPICER & LILLIE, 1959).

Deve-se destacar, ainda, que as proteoglicanas (compostos macromoleculares, que como vimos estão classificados dentro das mucossustâncias)

são sempre PAS negativas porque o tratamento usual com o ácido periódico falha na oxidação dos radicais vic-glicóis presentes nos ácidos glicurônico e idurônico.

2.3 Documentação fotográfica

Os preparados histológicos selecionados foram fotomicrografados no Fotomicroscópio Carl-Zeiss/Jena, modelo JENALUMAR.

3 — RESULTADOS

3.1 *Análise morfológica qualitativa*

3.1.1 **Pele dorsal**

Nas três espécies de anfíbios anuros em estudo, a **epiderme** (figuras 2, 3b, 12b e 12c) , é constituída por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, com células poligonais que variam de cilíndricas a pavimentosas, da base do epitélio para a superfície. Este epitélio está dividido em três estratos: basal (mais interno) – junto à lâmina basal, intermédio e córneo (mais superficial). O estrato basal (figuras 12c e 12d) é constituído por uma única camada de células cilíndricas, cujos núcleos são ovóides, de cromatina frouxa e nucléolo evidente; o citoplasma dessas células é basófilo. O estrato intermédio, por sua vez, é formado por duas ou três camadas celulares; as células da camada mais interna são cúbicas e vão tornando-se pavimentosas à medida que se aproximam da superfície. A camada córnea (figuras 12c e 12d) é formada por uma delgada faixa de células pavimentosas, a maioria das quais não possui mais o núcleo; em algumas células no entanto, observam-se ainda, remanescentes nucleares. O citoplasma dessas células apresenta-se preenchido por quantidade moderada de queratina, proteína básica que confere a esse citoplasma uma acidofilia discreta.

A **derme**, é subdividida em dois estratos: um superficial ou frouxo, subjacente à epiderme (figuras 2, 3a 3b), com fibras colágenas delgadas e esparsas, contendo glândulas mucosas, granulosas e lipídicas (estas últimas presentes, apenas, em uma das espécies); um estrato mais profundo (figura 3b), no qual as fibras

colágenas são espessas e compactas, orientadas em um único sentido, isto é, paralelas à superfície, caracterizando um tecido conjuntivo denso modelado.

As glândulas mucosas (figuras 3b, 10c e 12d) encontradas na derme são constituídas por um corpo glandular, uma região de transição (colo) e um ducto excretor que desemboca na superfície da epiderme. O corpo glandular é revestido por uma única camada de células que variam de cúbicas a cilíndricas, cuja secreção citoplasmática é granular e a luminal amorfa e homoganeamente acidófila. Essas glândulas, se comparadas com as glândulas granulosas, possuem distribuição mais constante e uniforme.

As glândulas granulosas exibem (figuras 9, 10a, 10b, 10e e 14), também, um ducto intra-epidérmico, um colo e corpo glandular, este revestido por uma camada de células sinciciais, que delimitam uma luz glandular que se encontra preenchida por grânulos esféricos e eosinofílicos.

A epiderme e a derme repousam sobre a hipoderme (tela subcutânea - figuras 1c e 10b), que é formada por um tecido conjuntivo frouxo, contendo células adiposas, vasos sanguíneos e nervos.

Logo abaixo da epiderme evidencia-se uma camada cromatófórica formada por melanóforos (figuras 1a, 2, 4c, 8 e 9) que são células que possuem melanina, cuja cor varia de castanha a preta; esses melanóforos apresentam prolongamentos citoplasmáticos que podem invadir a derme frouxa, circundando glândulas mucosas e granulosas presentes no local. Nesta camada cromatófórica podem-se observar, dependendo da espécie estudada, xantóforos (figura 12c) que possuem pigmentos amarelo-alaranjados, e iridóforos (figura 12c) que são células que têm como característica refletir a luz incidente.

3.1.2 Pele ventral

A **epiderme** da pele ventral (figuras 3a, 3b, 10a, 10b, 10c e 13) segue a mesma organização histológica descrita para pele dorsal. A diferença marcante entre essas duas regiões (dorsal e ventral) encontra-se no estrato intermédio, o qual possui na pele ventral um maior número de camadas celulares. A constituição da **derme** (figuras 3b, 10b e 10c) desta região segue também o mesmo padrão já descrito para pele dorsal. Na maioria das vezes, o número de glândulas presentes na pele ventral é maior do que àquele da pele dorsal. Além disso, a camada cromatófórica é, às vezes, descontínua e apresentando na sua unidade cromatófórica apenas um tipo celular – o melanóforo.

3.1.3 Glândula Cutânea Sexualmente Dimórfica

É uma característica secundária exclusiva dos machos adultos, nas três espécies de anfíbios anuros estudadas, a presença de um par de pequenas protuberâncias, localizadas, dependendo da espécie, nas regiões ventro-sacral, inguinal ou nos polegares, conhecidas como glândulas cutâneas sexualmente dimórficas (GCSD - figuras 5, 6, 7, 11a e 15a). Essas estruturas são constituídas por epiderme delgada, dividida também em três estratos: basal, intermédio, e córneo. Abaixo dessa epiderme observa-se a derme frouxa, contendo numerosos adenômeros, agrupados compactamente; a maioria desses adenômeros são morfologicamente semelhantes aos adenômeros granulados, no entanto, encontram-se, ainda, adenômeros mucosos esparsos e restritos à derme superficial. Os corpos dos adenômeros granulados formam unidades com aspecto de sacos alongados, cujo lúmen é completamente preenchido com grânulos esféricos e eosinófilos. Esses

adenômeros por serem extremamente desenvolvidos ocupam toda a derme frouxa, comprimindo a derme compacta, que fica, assim, restrita a uma faixa estreita. Os adenômeros mucosos possuem um pequeno corpo esférico, que ocupa predominantemente a região externa da derme superficial.

Tanto a derme frouxa como a derme compacta destas glândulas dimórficas, apoiam-se, também na tela subcutânea (hipoderme), que é formada por tecido conjuntivo frouxo.

3.1.4 *Cycloramphus dubius*

Em *Cycloramphus dubius*, a pele dorsal e a pele ventral seguem o padrão histológico já descrito; a camada cromatófórica não forma uma unidade verdadeira, posto que é formada por apenas um único tipo celular: os melanóforos (figuras 1a, 2 e 4c) que localizam-se logo abaixo da epiderme, circundando, às vezes, os corpos glandulares das glândulas presentes nesse local. A camada cromatófórica na pele ventral é irregular e menos freqüente; em vários segmentos essa camada está ausente.

Nesta espécie, a derme profunda ou compacta mostra-se constituída por duas subcamadas (figuras 1b e 1d), nas quais as fibras colágenas assumem arranjos distintos: na subcamada mais superficial as fibras dispõem-se em várias direções (tecido conjuntivo denso não modelado); na subcamada adjacente à hipoderme, as fibras colágenas estão dispostas seguindo uma única direção, isto é, organizam-se paralelamente à superfície cutânea (tecido conjuntivo denso modelado).

No *Cycloramphus dubius*, a glândula cutânea sexualmente dimórfica (GCSD - figuras 5, 6 e 7) apresenta-se como um par de protuberâncias lentiformes, com

aproximadamente 7 mm de comprimento, 4 mm de largura e 2 mm de espessura, localizadas na região ílio-sacra e denominadas “glândulas inguinais”. Essas protuberâncias são constituídas principalmente por adenômeros granuloso alongados (figuras 8a e 8b), agrupados compactamente e recobertos por epiderme delgada. O grande desenvolvimento desses adenômeros granuloso determinam um aumento considerável da derme frouxa e conseqüentemente uma diminuição acentuada da derme compacta, que fica, assim, restrita a estreita faixa localizada sobre a hipoderme (figura 7).

3.1.5 *Scinax hiemalis*

Em *Scinax hiemalis* a organização da pele (figuras 9, 10a, 10b, 10c e 10d) segue o padrão estrutural já descrito. Deve-se mencionar, no entanto, que nesta espécie, encontramos, logo abaixo da epiderme da pele dorsal, uma unidade cromatofórica verdadeira (figura 9), isto é, constituída por três tipos diferentes de células pigmentares distribuídas da seguinte maneira: internamente, essa camada cromatofórica apresenta os melanóforos (figura 9), em localização mais superficial (junto à epiderme) encontram-se os xantóforos, e na porção intermédia, localizam-se os iridóforos (figura 9). Na pele ventral, no entanto, esta unidade apresenta-se descontinua e formada unicamente por melanóforos.

Em *Scinax hiemalis*, a glândula cutânea sexualmente dimórfica (GCSD - figuras 11a, 11b e 11c) está localizada na região ventro-sacral, sendo difícil sua observação em nível macroscópico. A organização dessa glândula segue o mesmo padrão descrito para a espécie *Cycloramphus dubius*, no entanto deve-se destacar que

os adenômeros granulosos de *Scinax hiemalis* são menos alongados que àqueles de *Cycloramphus dubius*.

3.1.6 *Phyllomedusa burmeisteri*

Em *Phyllomedusa burmeisteri*, a pele dorsal e ventral (figuras 12a, 12b, 12c, 12d, 13 e 14) mostram, também, o mesmo padrão histológico exibido pelas duas outras espécies. Nesta espécie, entretanto, não se consegue estabelecer os limites entre derme frouxa e compacta. Além disto, esta espécie apresenta em terceiro tipo glandular - uma glândula que secreta lípidos, denominada glândula lipídica (figuras 25a e 25b).

Nesta espécie a unidade cromatófórica da pele dorsal é constituída pelos três tipos de células pigmentares: melanóforos, iridóforos e xantóforos (figura 12c). Deve-se destacar que nesta espécie os melanóforos não circundam os corpos glandulares.

A glândula cutânea sexualmente dimórfica (figuras 15 a, b e c), situada nos polegares das patas dianteiras dos animais, chamadas coxins nupciais (nuptial pads), exhibe o padrão histológico das duas outras glândulas cutâneas sexualmente dimórficas já descritas. Notando-se, no entanto, que a epiderme que recobre estes coxins é bem mais espessa apresentando espículas córneas. Além disto, nestes coxins não há adenômeros mucosos que só foram encontrados nas outras duas glândulas dimórficas de *C. dubius* e *S. hiemalis*.

3.2 *Análise histoquímica*

Com o objetivo de obter-se um perfil histoquímico para o tegumento e para as glândulas dimórficas das três espécies de anfíbios anuros, foram realizadas reações histoquímicas com a finalidade de detectar-se mucossubstâncias neutras e ácidas, proteínas e lipídios.

Os resultados obtidos mostraram que a reação do PAS (específica para açúcar neutro) é fortemente positiva para as glândulas mucosas presentes nas regiões dorsal e ventral da pele das três espécies estudadas (figuras 17a, 17b, 17c 19a e 19b). Positividade de igual magnitude foi também, evidenciada nas glândulas mucosas presentes nas glândulas dimórficas de duas das espécies em estudo (figuras 18a e 18b, e tabela I). No que diz respeito à reação do azul de Alcian em pH 2,5 os resultados vieram mostrar que no *Cycloramphus dubius* a hipoderme apresenta-se fortemente positiva, tanto na região dorsal quanto na ventral (figuras 20a e 20b). Nessa espécie, a hipoderme da glândula inguinal , não mostra positividade. Com pH 0,5 a reação do azul de Alcian foi também positiva nas regiões mencionadas, porém, muito mais tênue. Nas espécies *Scinax hiemalis* e *Phyllomedusa burmeisteri*, a reação do azul de Alcian em pH 2,5 é ligeiramente positiva para as glândulas mucosas da pele das regiões dorsal e ventral (figuras 21a, 21b, 22 e 23) e da glândula dimórfica ventro-sacral presente na primeira espécie. Em pH 0,5 essa reação mostrou-se negativa nesses locais. Quando necessário, os bloqueios apropriados foram realizados para obter-se a confirmação dos resultados.

A análise dos resultados obtidos veio mostrar que a secreção das glândulas mucosas das três espécies possuem na sua composição açúcares neutros. Constatação válida para as glândulas mucosas das diferentes regiões, com exceção do coxín nupcial da *Phyllomedusa burmeisteri*.

Com relação às proteínas, a reação da ninhidrina-Schiff foi moderadamente positiva para as glândulas mucosas presentes nas regiões dorsal e ventral (figuras 24a, 24b, 24d e 24e) de todas as três espécies estudadas. No entanto, nos adenômeros mucosos presentes nas glândulas dimórficas de *Cycloramphus dubius* (figura 24c) e de *Scinax hiemalis*, essa reação foi moderada e fracamente positiva, respectivamente (tabela I).

No que se refere às glândulas granulosas da pele dorsal e ventral das três espécies a reação mostrou-se fracamente positiva. Por outro lado, os adenômeros granulosos das glândulas dimórficas exibiram positividade moderada em *C. dubius* (figura 24c) e fraca em *S. hiemalis* e *P. burmeisteri* (tabela I).

A reação do Sudan-black mostrou-se fortemente positiva para as glândulas lipídicas presentes na pele dorsal e ventral de *P. burmeisteri* (figuras 25a e 25b).

A coloração pelo Picrossirius-hematoxilina acoplada à observação pela microscopia de polarização permitiu evidenciar o arranjo das fibras de colágeno, tanto da derme frouxa quanto da derme compacta (figuras 16: a, b, c, d e f).

3.3 *Análise morfológica quantitativa*

3.3.1 *Cycloramphus dubius*

As medidas para avaliar a espessura da pele dorsal e ventral bem como de suas diferentes camadas foram realizadas em seis machos e três fêmeas. Esses valores estão discriminados nas tabelas II e III, e nos gráficos 1, 3, 9, 12, 14 e 17.

Os valores obtidos para a glândula inguinal de machos adultos e juvenis encontram-se discriminados na tabela IV e no gráfico 5, 19 e 20 .

A avaliação dos diâmetros das glândulas mucosas e granulosas presentes na pele dorsal, ventral e glândula cutânea sexualmente dimórfica foi feita nos mesmos animais, sendo que esses valores estão nas tabelas V e VI e nos gráficos 6, 7, 23, 26, 28, 29 e 32.

3.3.2 *Scinax hiemalis*

As medidas para avaliar a espessura da pele dorsal e ventral bem como de suas diferentes camadas foram feitas em seis animais (três machos e três fêmeas). Esses valores estão discriminados nas tabelas II e III, e nos gráficos 1, 3, 11, 13, 15 e 18.

Os valores obtidos para a glândula ventro sacral de machos encontram-se discriminados na tabela IV e no gráficos 5 e 21.

A avaliação dos diâmetros das glândulas mucosas e granulosas presentes na pele dorsal, ventral e glândula cutânea sexualmente dimórfica foi aplicada nos mesmos animais, e esses valores se encontram nas tabelas V e VI e nos gráficos 6, 7, 24, 27, 30 e 33.

3.3.3 *Phyllomedusa burmeisteri*

As medidas para avaliar a espessura da pele dorsal e ventral, assim como das diferentes camadas foram executadas em um animal (macho adulto). Esses valores estão contidos nas tabelas II e III e nos gráficos 2, 4, 10 e 16 .

As medidas obtidas para a espessura das diferentes camadas: epiderme, derme frouxa, derme compacta e hipoderme do coxín nupcial foram realizadas em três machos adultos, e encontram-se discriminadas na tabela IV e no gráficos 5 e 22.

A avaliação dos diâmetros das glândulas mucosas, granulosas e lipídicas presentes na pele dorsal e ventral foi realizada no mesmo animal, e os valores dos diâmetros encontram-se nas tabelas V, VI e VII e nos gráficos 6, 7, 8, 25, 29, 31 e 34. Para a glândula cutânea sexualmente dimórfica (GCSD) os diâmetros dos adenômeros granulosos estão contidos na tabela VI e no gráfico 29.

4 — DISCUSSÃO

Do ponto de vista morfológico, fisiológico e bioquímico, a pele dos anfíbios é um órgão complexo que desempenha uma variedade de funções necessárias à sobrevivência desses animais (DUELLMAN & TRUEB, 1986). A pele tem um papel importante não só na sobrevivência diária dos anfíbios como também em sua capacidade de utilização de diferentes nichos ecológicos. Sabe-se que a função desse órgão não se restringe apenas à respiração, à regulação hídrica, à defesa contra predadores, bactérias e fungos: ela está relacionada, também, com a excreção e o controle da temperatura, com a reprodução e a camuflagem (HEATWOLE et al., 1994; HOUGH & SEVER, 1994). Todas essas funções devem ser conciliadas de tal modo que uma não venha a prejudicar o funcionamento da outra. Apesar de sua ampla tolerância às variações climáticas, os anfíbios são, no entanto, incapazes de suportar alterações ambientais bruscas, uma vez que sua pele nua e permeável os torna particularmente vulneráveis à repentina perda de água.

Neste trabalho, nas três espécies de anfíbios anuros estudadas, pôde-se constatar que, do ponto de vista histológico, a pele possui a mesma organização estrutural, apresentando, no entanto, pequenas variações.

Essas variações dizem respeito à espessura de suas diferentes camadas, ao tipo e ao número de glândulas presentes em regiões distintas, ao arranjo das fibras colágenas da derme e à distribuição e ao número de componentes da unidade cromatofórica.

Assim, em *C. dubius*, *S. hiemalis* e *P. burmeisteri*, tanto a pele dorsal como a ventral são constituídas por duas camadas distintas: epiderme e derme. A epiderme, de origem ectodérmica, exhibe os estratos basal, intermédio e córneo —

este último representado por uma única camada de células pavimentosas com citoplasma fracamente eosinofílico; algumas destas células apresentam, ainda, restos nucleares, não existindo, portanto, uma camada córnea verdadeira. A derme, de origem mesodérmica, apresenta duas subcamadas: a mais superficial, composta por um tecido conjuntivo frouxo (derme frouxa) contendo quantidade variável de glândulas multicelulares; a mais profunda (derme compacta), constituída por um tecido conjuntivo denso. Esse complexo epiderme-derme repousa sobre uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo (hipoderme ou tela subcutânea) que contém células adiposas, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Como se vê, essa organização estrutural da pele segue o mesmo padrão já descrito para outras espécies de anuros (HOSTETLER & CANNON, 1974; BLAYLOCK et al., 1976; CANNON & HOSTETLER, 1976; BANI et al., 1985; CLARKE, 1997). Além disso, os nossos resultados mostram que tanto a espessura da epiderme da pele ventral como o número de glândulas mucosas dessa região são maiores, se comparados àqueles da pele dorsal; a unidade cromatófórica da pele ventral, quando presente, é descontínua, apresentando um só tipo celular — o melanóforo; outra característica marcante da pele do ventre do animal é a presença de reentrâncias profundas em sua superfície, que aparecem a intervalos regulares. Esses dados concordam com aqueles descritos na literatura, no que diz respeito às características básicas da pele ventral da maioria dos anuros (BANI et al., 1985).

Com relação ao *C. dubius*, deve-se destacar que nesta espécie a derme compacta (profunda) mostra dois arranjos distintos para as espessas fibras colágenas: superficialmente, essas fibras orientam-se em várias direções, constituindo, assim, um tecido conjuntivo denso não modelado; na região adjacente à hipoderme, essas fibras dispõem-se seguindo uma única direção, o que caracteriza um tecido

conjuntivo denso modelado. Por outro lado, em *P. burmeisteri*, os limites entre a derme frouxa e a derme compacta não são nítidos como nas duas outras espécies deste estudo.

Os resultados quantitativos obtidos pela medida da espessura das diferentes camadas da pele vieram mostrar que para *C. dubius* as proporções ocupadas pela epiderme, derme frouxa e derme compacta, mantêm-se equivalentes tanto na pele dorsal quanto na ventral. Assim, em *C. dubius* a proporção da espessura total da pele ocupada pela epiderme, derme frouxa e derme compacta correspondem, respectivamente, a 14, a 29 e a 57% (gráfico 9). Em *P. burmeisteri*, espécie com tamanho corporal semelhante ao da espécie *C. dubius*, a epiderme e a derme ocupam, respectivamente, 11 e 89% (gráfico 10) da espessura total da pele, valores válidos para a pele dorsal e ventral. Em *S. hiemalis*, a menor das espécies estudadas, encontra-se também uma equivalência na proporção da espessura das diferentes camadas constituintes da pele dorsal e ventral; nesta espécie, porém, a derme frouxa é extremamente desenvolvida, correspondendo a cerca de 60% (gráfico 11) da espessura total da pele.

Os dados da literatura mostram que as adaptações anatômicas que permitem à pele tornar-se um órgão permeável à água (facilitando, assim, a regulação hídrica), estão relacionadas não só com a espessura da epiderme (mais especificamente de sua camada córnea) mas também com a espessura da derme e o arranjo de suas fibras colágenas, além do número e da disposição dos cromatóforos (CHRISTENSEN, 1974; BANI et al., 1985; DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Das três espécies estudadas, nenhuma delas está exposta diretamente ao ambiente seco por longos períodos: por essa razão, a espessura da camada córnea das mesmas restringe-se a uma única camada de células fracamente queratinizadas.

Além disso, em *S. hiemalis* (a espécie que vive no ambiente mais úmido, se comparada com as outras duas), a espessura da derme frouxa é considerável — sugerindo que neste animal a economia de água não é tão necessária. Em *C. dubius*, no entanto, tratando-se de animal que vive em ambiente mais seco, a derme compacta (onde as fibras colágenas são espessas e compactamente agrupadas) apresenta-se bem desenvolvida, permitindo um controle mais eficiente da perda de água. Nessa espécie, além disso, a unidade cromatóforica é constituída só por melanóforos, diferentemente das outras duas espécies, em que existe uma unidade cromatóforica verdadeira, com os três tipos de células pigmentares. Como se sabe, a presença de uma camada mais espessa de cromatóforos contribui para a regulação hídrica, levando, nas situações em que isso é necessário, a uma menor perda de água (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Por outro lado, em *P. burmeisteri* os mecanismos que controlam o equilíbrio hídrico estão relacionados com a presença de glândulas lipídicas, característica exclusiva da família Phyllomedusinae — fato que será novamente abordado mais adiante, quando forem apresentados os comentários sobre as glândulas cutâneas.

As glândulas presentes na derme frouxa da pele dorsal e ventral das três espécies possuem a mesma organização histológica — isto é, são constituídas por um ducto intraepidérmico, um colo ou pescoço (região intercalar) e um corpo glandular (porção secretora).

Com relação às glândulas mucosas, os resultados vieram mostrar que essas glândulas apresentam características muito similares não só entre as espécies aqui estudadas como também com outras espécies já descritas na literatura (DAPSON, 1969; BUENO et al., 1981; SCHUMACHER et al., 1994; CLARKE,

1997). Assim, o corpo (porção secretora) dessas glândulas ocupa a porção mais superficial da derme frouxa, sendo constituído por um epitélio simples (cúbico ou cilíndrico) que delimita uma luz ampla que, na maioria das vezes, apresenta-se vazia. A secreção mucosa quando presente na luz glandular é amorfa e homogênea, contrastando com o aspecto granular dessa secreção quando se encontra ainda no citoplasma da célula.

Por outro lado, a análise dos resultados histoquímicos obtidos veio mostrar que a secreção das glândulas mucosas das três espécies possuem na sua composição açúcares neutros e proteínas — provavelmente associados — formando uma glicoproteína. Esse muco neutro, como se sabe, está relacionado não só com a lubrificação da superfície corporal (evitando, assim, a abrasão mecânica da pele), como também, e principalmente, impedindo a dessecação da mesma (DAPSON, 1969; LILLYWHITE & LICHT; 1975, BUENO et al. 1981; CLARKE, 1997)). Em *Scinax hiemalis* e *Phyllomedusa burmeisteri*, o muco possui ainda açúcares ácidos carboxilados. Esse muco ácido poderia estar associado a uma proteção mais eficiente contra a invasão de microorganismos (fungos e bactérias), uma vez que os anfíbios vivem em ambientes ricos nesses agentes potencialmente patogênicos. No entanto, eles raramente são afetados por infecções bacterianas ou fúngicas — mostrando, dessa forma, possuir um sistema eficiente de defesa que opera em nível da superfície corporal, requisito importante para sua sobrevivência (CEVIKBAS, 1977; CLARKE, 1997).

Os valores obtidos para os diâmetros dos corpos glandulares mucosos mostram que os menores valores foram encontrados em *S. hiemalis*, a menor das espécies estudadas. No entanto, considerando-se que a espessura da pele dessa espécie é cerca de duas vezes mais fina do que das outras duas, pode-se dizer que as

glândulas mucosas são bem desenvolvidas nessa espécie, uma vez que essas glândulas são apenas cerca de 29% menores do que aquelas presentes em *C. dubius* e *P. burmeisteri*.

Essa exuberância de tamanho exibida pelas glândulas mucosas de *S. hiemalis* relaciona-se, provavelmente, com a maior produção de muco — cuja finalidade seria dar maior proteção contra a abrasão mecânica e contra a proliferação de fungos, visto que essa espécie não só possui uma pele muito fina (delicada e vulnerável, portanto), como também vive em lugar mais úmido, se comparada com as outras duas. Por outro lado, nas outras duas espécies, *C. dubius* e *P. burmeisteri*, com tamanho corpóreo semelhante, as glândulas mucosas possuem corpos glandulares de igual magnitude.

No que se refere às glândulas granulosas presentes na pele dorsal e ventral das três espécies consideradas, pôde-se constatar que as mesmas seguem o mesmo padrão estrutural das mucosas — isto é, possuem ducto intraepidérmico, colo e corpo glandular, este último constituído por uma única camada de células sinciciais achatadas que circundam um lúmen completamente preenchido por grânulos esféricos e eosinofílicos. Esses corpos glandulares granulosos ocupam toda a derme frouxa.

A análise histoquímica da secreção dessas glândulas granulosas veio mostrar que a mesma não apresenta açúcares neutros e/ou ácidos em sua composição, fato constatado pela negatividade das reações do PAS e do azul de Alcian, respectivamente. No entanto, a secreção dessas glândulas apresenta proteínas evidenciadas pela reação da ninhidrina-Schiff.

Sabe-se que a maioria das glândulas granulosas presentes na pele dos anfíbios vem sendo correlacionada com a produção de substâncias potencialmente

tóxicas que seriam responsáveis pela defesa passiva desses animais contra eventuais predadores (DAPSON et al., 1973; TOLEDO et al., 1995; CLARKE, 1997). Foi, também, demonstrado que essas glândulas, em certas espécies, produzem substâncias que não só previnem o crescimento e a proliferação de microorganismos (fungos, bactérias, etc.) na pele dos animais, mas funcionam, também, como estimulantes (feromônios), tornando a fêmea mais receptiva ao macho durante a corte e o acasalamento (SEVER, 1989; CLARKE, 1997).

Quando se analisam os valores obtidos para os diâmetros dos corpos glandulares granulosos presentes na pele dorsal e ventral, observa-se que os mesmos não diferem muito entre si em *Scinax hiemalis* e *Cycloramphus dubius*, mas mostra que nas três espécies essas glândulas são sempre mais desenvolvidas se comparadas às glândulas mucosas.

Numa das espécies estudadas, *P. burmeisteri*, representante da família Phyllomedusinae, observou-se a presença de um terceiro tipo de glândula — uma glândula que secreta lípidos. Esta glândula apresenta o corpo glandular constituído por uma única camada de células cubóides e a luz preenchida por pequenos vacúolos esféricos e claros. Usando-se o Sudan black pôde-se constatar que esses vacúolos coraram-se fortemente em negro, sugerindo a presença de conteúdo lipídico nos mesmos.

Sabe-se que em algumas espécies do gênero *Phyllomedusa* a presença dessas glândulas lipídicas está relacionada não só com a diminuição da evaporação cutânea como também com o comportamento de muda exibido por essas espécies. Assim, ao amanhecer, as pererecas dessa família espalham sobre a superfície corporal a secreção oriunda das glândulas lipídicas mediante uma série de movimentos específicos (*wiping behavior*). Depois disso, permanecem imóveis, em torpor,

durante todo o dia. Ao anoitecer, através de uma série de movimentos (*moulting behavior*), elas retiram não só a película lipídica — que as protegera durante o dia contra a perda de água —, como também o estrato córneo da epiderme, liberando, ainda, grande quantidade de secreção mucosa; assim, com a pele novamente permeável, tornam-se ativas (BLAYLOCK et al., 1976; CASTANHO & De LUCA, 1997).

Antes de iniciar-se a discussão das glândulas cutâneas sexualmente dimórficas (GCSD) ou, simplesmente, glândulas dimórficas, foco principal deste trabalho, deve-se esclarecer que será usado o termo *adenômero* para referir-se a cada uma das "glândulas" que compõem a glândula dimórfica, de maneira a conferir-se maior clareza ao texto — pois poderia parecer estranho dizer-se que as glândulas cutâneas sexualmente dimórficas são constituídas por "glândulas". Além disso, deve-se salientar, ainda, que a designação *adenômero* é utilizada, por alguns autores, para referir-se apenas à porção secretora (corpo glandular) da glândula; outros, no entanto, usam-na para nomear a unidade glandular como um todo: porção secretora, colo e ducto excretor. Neste trabalho, como todas as glândulas presentes nas diferentes regiões da pele têm a mesma organização estrutural e com unidades glandulares independentes entre si, ambas as definições são pertinentes e não comprometem a inteligibilidade do texto.

A análise histológica das glândulas cutâneas sexualmente dimórficas das três espécies mostra que as mesmas são constituídas por numerosos adenômeros granulosos, agrupados compactamente, e por adenômeros mucosos, em pequeno número e esparsamente distribuídos — ambos circunscritos ao estrato esponjoso da derme (derme frouxa) e cobertos por epiderme delgada. Os adenômeros granulosos são sempre extremamente desenvolvidos, isto é, bem maiores do que aqueles

presentes em outras regiões da pele — comprimindo a derme compacta, que fica, assim, restrita a uma faixa estreita situada logo acima da hipoderme.

A análise dos resultados histoquímicos obtidos para as glândulas cutâneas sexualmente dimórficas (GCSD) de *C. dubius* e *S. hiemalis* — glândula inguinal e glândula ventro-sacral, respectivamente —, veio mostrar que o muco proveniente dos poucos e esparsos adenômeros mucosos presentes nessas glândulas é qualitativamente igual àquele das glândulas mucosas de outras regiões da pele. Esse muco contém açúcares neutros e proteínas em *C. dubius*; açúcares neutros e ácido (além de proteínas), no caso de *S. hiemalis*; como se viu, a glândula nupcial de *P. burmeisteri* não possui adenômeros mucosos.

No que se refere aos adenômeros granuloso que predominam nas glândulas dimórficas das três espécies, pôde-se constatar que a secreção possui proteína revelada pela reação da ninhidrina-Schiff; esses resultados concordam com aqueles obtidos por THOMAS et al. (1993b) para a glândula nupcial da espécie *Xenopus laevis*. Nossos resultados diferem, no entanto, daqueles encontrados para *Xenopus laevis*, no que diz respeito à presença de açúcar neutro — isto é, a secreção granulosa das três glândulas dimórficas de nosso estudo não possui açúcares neutros em sua composição, fato este constatado pela negatividade da reação do PAS. Por outro lado, tanto as glândulas dimórficas deste nosso estudo quanto a de *Xenopus laevis* apresentam reações negativas para o azul de Alcian nos adenômeros granuloso, confirmando a ausência de açúcares ácidos na composição da secreção proveniente desses adenômeros (THOMAS et al., 1993b).

Nas três espécies estudadas, observou-se que as glândulas dimórficas (GCSD) constituem característica secundária exclusiva de machos adultos, formando protuberâncias macroscopicamente visíveis em duas espécies: glândulas inguinais

em *C. dubius* e glândulas nupciais em *P. burmeisteri*; as glândulas ventro-sacrais de *S. hiemalis* são de observação difícil ao nível macroscópico, mas histologicamente mostram a organização estrutural semelhante às glândulas dimórficas das duas outras espécies. Destas três glândulas, a única que pode ser considerada, no momento, como uma *breeding gland* — por analogia àquela de *Xenopus laevis* — é a glândula nupcial de *P. burmeisteri* presente nos polegares dos machos adultos na época reprodutiva; essas glândulas nupciais de *P. burmeisteri* apresentam não só morfologia semelhante àquela da espécie *X. laevis* como também maior desenvolvimento na época reprodutiva. A provável função desempenhada por essas glândulas é colaborar na intensificação do amplexo do macho — ou, então, contribuir para a liberação de sinais químicos (feromônios) que tornem a fêmea mais receptiva ao macho (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Das espécies estudadas, foram feitas observações de campo (GIARIETTA, 1995; DE LUCA et al., 1996) em apenas uma delas, em *C. dubius*; essas observações mostraram que os machos dessa espécie não só defendem seu território contra eventuais predadores como também cuidam tanto dos ovos como de sua prole. Assim sendo, os resultados obtidos da análise histológica das glândulas inguinais são compatíveis com o comportamento reprodutivo exibido por esses animais. A glândula inguinal dos machos adultos com prole mostra-se muito aumentada em relação àquela dos machos adultos sem prole ou dos machos jovens. Nos machos adultos com prole, os adenômeros granulosos apresentaram máximo desenvolvimento. As fêmeas dessa espécie, como já foi dito, não possuem glândula inguinal; no entanto, na região correspondente à da glândula do macho, foi encontrado um acúmulo de adenômeros granulosos, os quais possuem tamanho bastante reduzido; deve-se salientar que esse acúmulo glandular presente na fêmea

não é observado macroscopicamente. Partindo-se desses dados, pode-se inferir que as glândulas inguinais de *C. dubius*, por serem atributo exclusivo de machos adultos e por estarem mais desenvolvidas na época reprodutiva, estariam envolvidas em alguma etapa do comportamento reprodutivo exibido por essa espécie.

Com relação às glândulas ventro-sacrais presentes em *S. hiemalis* pôde-se verificar que as mesmas estão presentes apenas nos machos adultos, exibindo, também, maior desenvolvimento à época reprodutiva.

Os dados histoquímicos obtidos neste trabalho para as glândulas dimórficas das três espécies apresentam diferenças e semelhanças não só com relação àqueles da glândula nupcial de *Xenopus laevis*, como também no que diz respeito a outros acúmulos glandulares dispersos pelo corpo de outras espécies estudadas por THOMAS et al. (1993a). Esses dados não permitem, no entanto, que se afirme, com base nesse perfil histoquímico, que duas das três glândulas dimórficas aqui estudadas — as glândulas inguinais e as glândulas ventro-sacrais — possam ser classificadas, sem sombra de dúvida, como uma *breeding gland*, mesmo no sentido mais amplo proposto pelos autores acima mencionados.

Assim, este trabalho abre perspectivas para novos estudos que, utilizando metodologia apropriada, visem demonstrar a dependência hormonal dessas glândulas — trabalhos, por exemplo, que permitam a castração dos machos e/ou o uso de testosterona, com o intuito de verificar-se a ocorrência de mudanças morfológicas nesses acúmulos glandulares (macroscópicos ou não) exibidos pelo macho. Nessa mesma linha de estudo, poder-se-ia ainda pesquisar a existência, nessas glândulas, de receptores para andrógenos.

Recentemente, THOMAS & LICHT (1993b) demonstraram que em *Rana pipiens* e *Xenopus laevis* a morfologia das glândulas cutâneas presentes no dorso dos

machos dessas duas espécies respondem não só à castração como ao tratamento com testosterona.

Assim sendo, há uma crescente evidência de que, nos anfíbios anuros, glândulas exócrinas dispersas pela pele podem constituir-se em características sexuais secundárias, respondendo prontamente às mudanças hormonais. Esse fato vem questionar a generalização que tem sido feita até agora, de que a pele dos anfíbios possui três tipos de glândulas: a onipresente serosa (granulosa ou de veneno), a mucosa, e a glândula lipídica dos Phyllomedusinae (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

5 — CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu que se chegasse às seguintes conclusões:

1ª) Do ponto de vista histológico, a pele e as glândulas cutâneas das três espécies estudadas possuem um padrão estrutural comum, apresentando, no entanto, pequenas variações relacionadas principalmente com o habitat ecológico e os hábitos do animal.

2ª) O perfil histoquímico apresentado pelas glândulas mucosas das regiões dorsal e ventral da pele é semelhante para as três espécies — isto é, as três espécies possuem açúcar neutro provavelmente ligado à proteína na composição do muco; uma das espécies mostra, ainda, reação positiva para açúcar ácido carboxilado.

3ª) A secreção das glândulas granulosas das peles dorsal e ventral apresenta reação positiva para proteínas.

4ª) A espécie *P. burmeisteri* apresenta glândulas lipídicas relacionadas não só com a diminuição da evaporação cutânea como também com o comportamento de muda exibido por essa espécie.

5ª) Na espécie *Scinax hiemalis* identificou-se histologicamente, pela primeira vez, um acúmulo de glândulas na região ventro-sacral.

6ª) As glândulas cutâneas sexualmente dimórficas das três espécies apresentam morfologia e perfil histoquímico muito semelhante; das três, no entanto, só a glândula nupcial de *P. burmeisteri* pode ser considerada como uma *breeding gland* propriamente dita: as outras duas necessitariam que novos estudos fossem realizados para enquadrar-se na denominação de *breeding glands*.

7ª) As observações de campo realizadas para a espécie *C. dubius*, acopladas à morfologia exibida pelas glândulas inguinais à época reprodutiva, sugerem fortemente que essas glândulas estejam relacionadas com o comportamento reprodutivo desse animal.

8ª) Este trabalho abre perspectivas para novos estudos que tenham por objetivo caracterizar as glândulas ventro-sacrais e glândulas inguinais (glândulas dimórficas das espécies *S. hiemalis* e *C. dubius*, respectivamente) como glândulas efetivamente relacionadas com a reprodução desses animais — definindo, ainda, o exato papel desempenhado por essas glândulas.

6 — FOTOMICROGRAFIAS

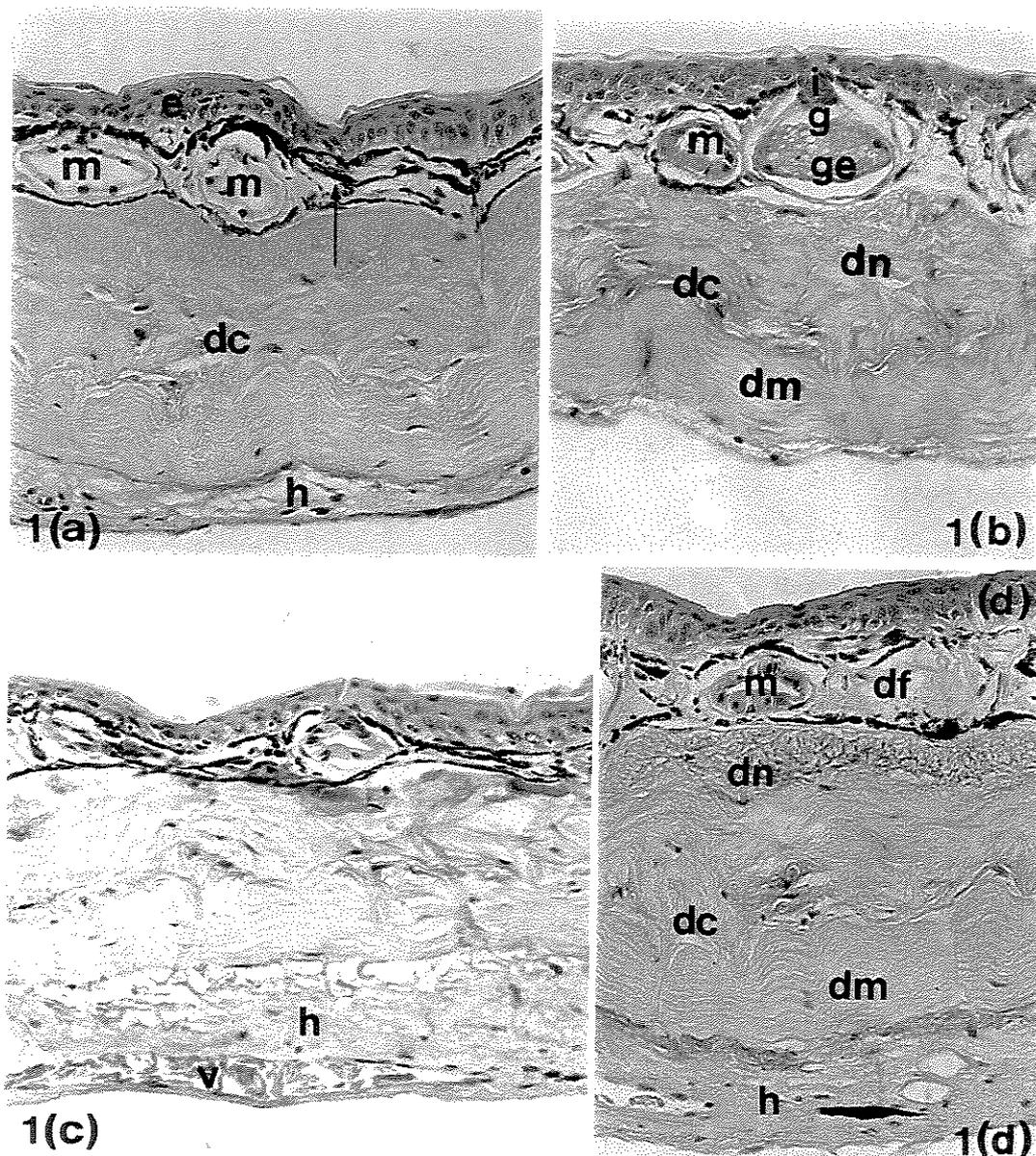


Fig. 1 — *Cycloramphus dubius* (macho adulto) - Pele dorsal

(a) - Epiderme (e); derme frouxa preenchida por melanóforos (seta) e glândulas mucosas (m) cuja luz apresenta-se vazia (sem secreção), derme compacta (dc) e hipoderme (h). HE. 256x.

(b) - Observar na derme frouxa uma glândula mucosa (m) e uma glândula granulosa (g) com ducto intraepidérmico (i), apresentando luz preenchida por grânulos esféricos (ge). Notar que a derme compacta (dc) exhibe dois arranjos distintos de fibras colágenas — mais superficialmente, essas fibras apresentam-se orientadas em várias direções (dn); mais internamente, as mesmas organizam-se em feixes que se dispõem paralelamente à superfície da pele (dm). Tricrômico de Masson (TM). 256x.

(c) - Notar a hipoderme (h) e a presença de vaso sangüíneo (v). HE. 256x.

(d) - Derme frouxa (df) com glândula mucosa (m); derme compacta (dc), formada por duas subcamadas: tecido conjuntivo denso não modelado (dn) e tecido conjuntivo denso modelado (dm); hipoderme (h). HE. 256x.

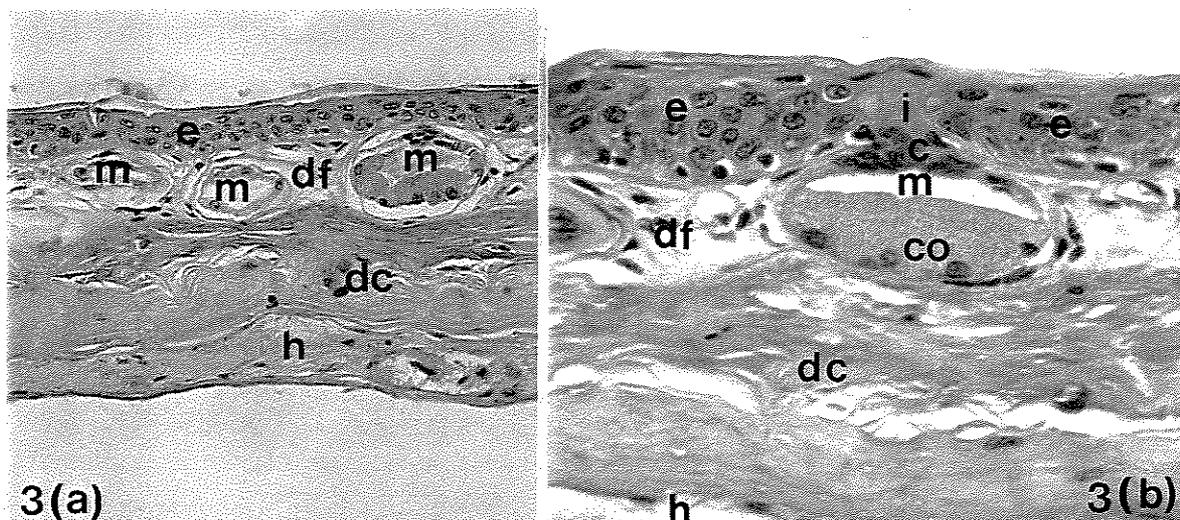
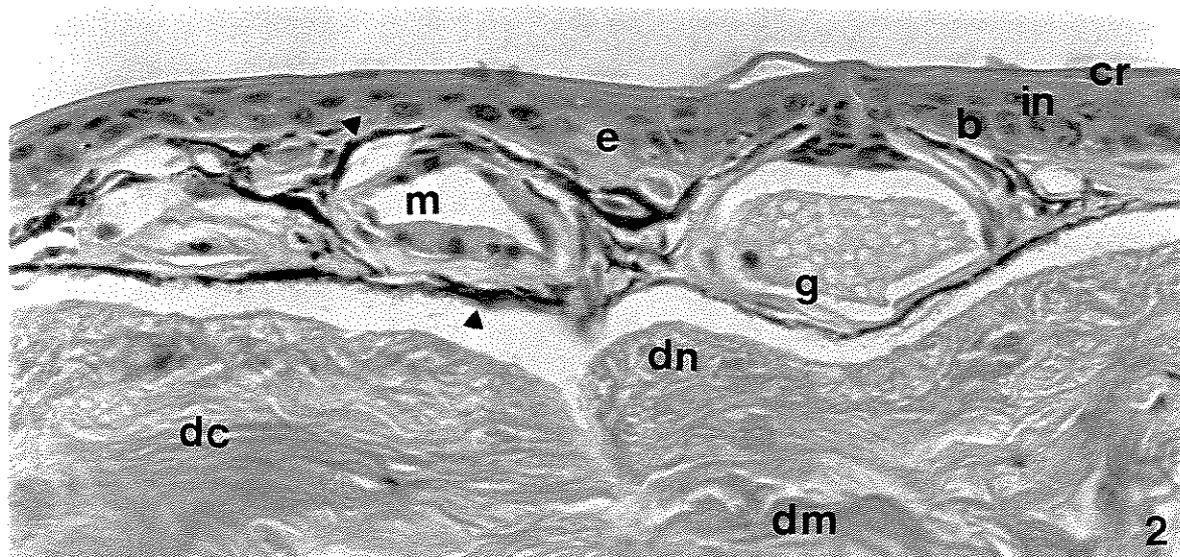


Fig. 2 — *Cycloramphus dubius* (macho adulto) - **Pele dorsal**: observam-se a epiderme (e) constituída pelos estratos basal (b), intermédio (in) e córneo (cr); derme esponjosa com glândula mucosa (m) e glândula granulosa (g). Notar na derme compacta (dc) os dois arranjos distintos das fibras colágenas (dn e dm). Observar os melanóforos localizados abaixo da epiderme e circundando os corpos glandulares (cabeça de seta). HE. 512x.

Fig. 3 — *Cycloramphus dubius* (macho adulto) - **Pele ventral**

(a) - Observam-se a epiderme (e), a derme frouxa (df) contendo glândulas mucosas (m), derme compacta (dc) e hipoderme (h). HE. 256x.

(b) - Notar que a epiderme da pele ventral é mais espessa do que da pele dorsal (e); a derme frouxa (df) apresenta uma glândula mucosa (m) na qual se pode ver o corpo glandular (co) constituído por células piramidais de núcleo esférico localizado na base da célula; nesta glândula, são, ainda, visíveis o colo (c) e o ducto intraepidérmico (i); derme compacta (dc) e hipoderme (h). HE. 512x.

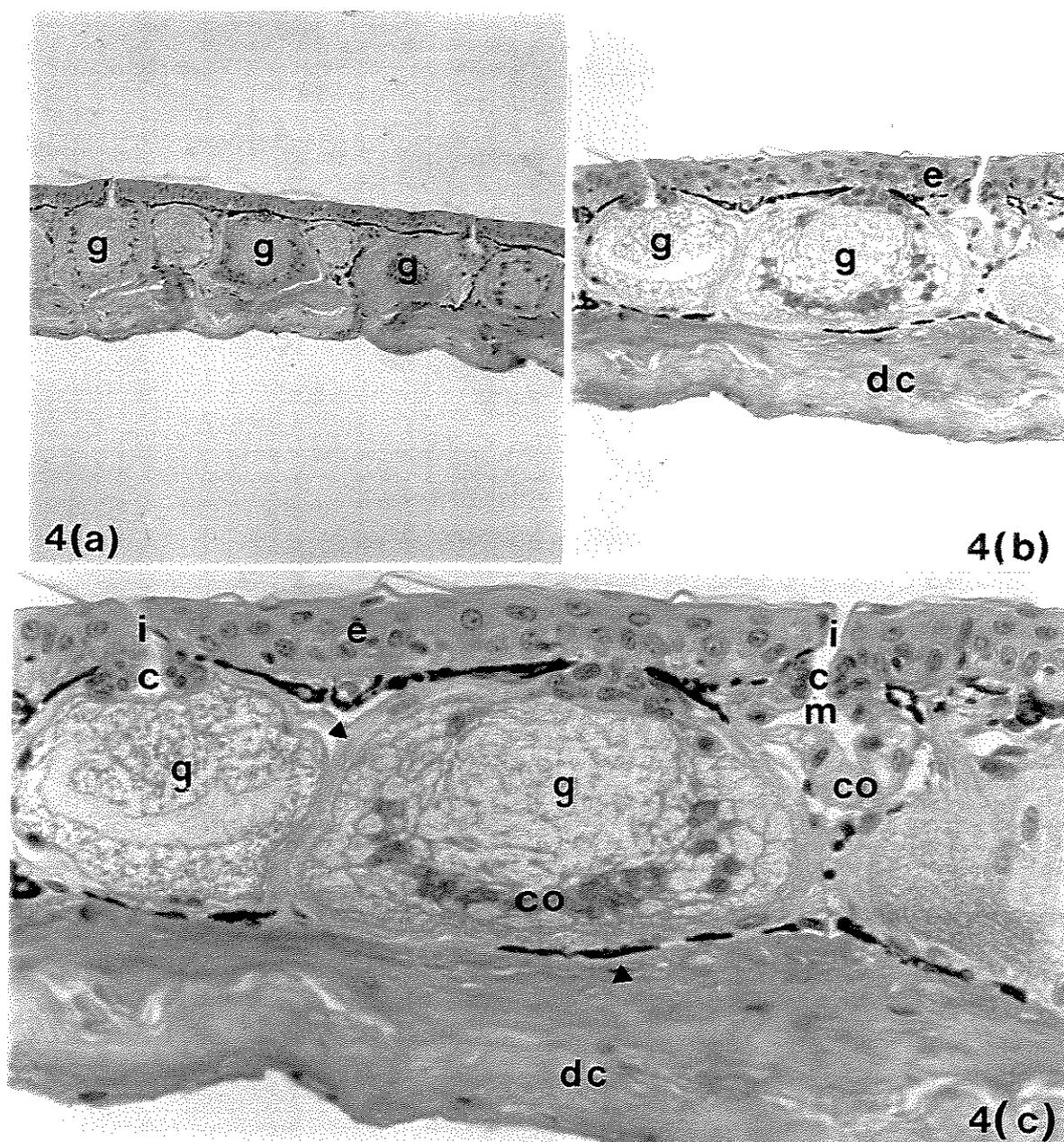
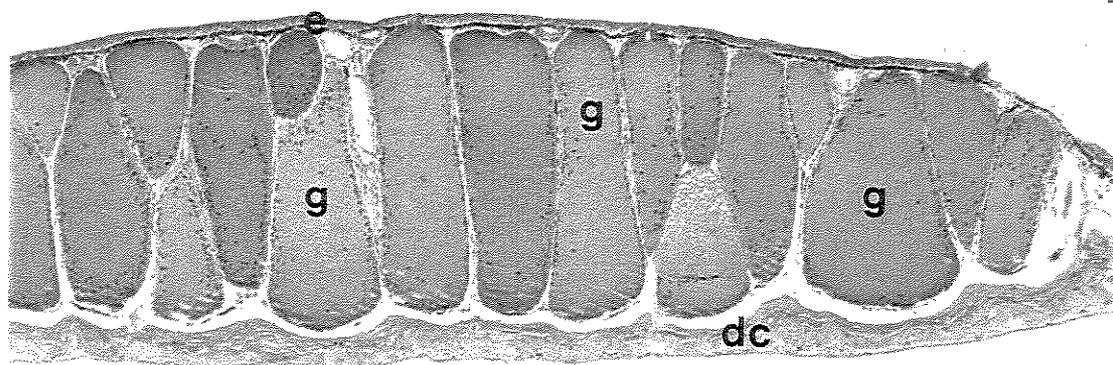


Fig. 4 — *Cycloramphus dubius* (fêmea adulta)

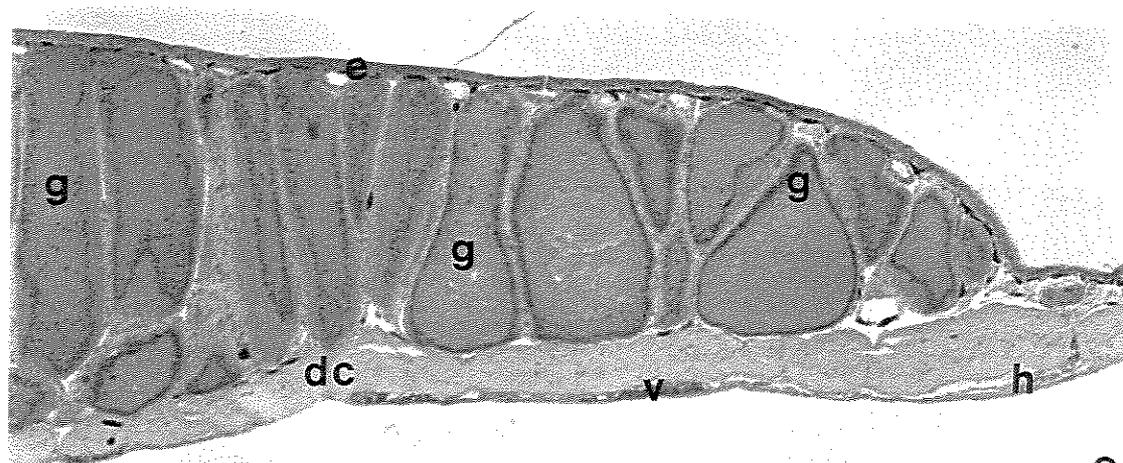
(a) - Vista panorâmica da região equivalente à glândula inguinal do macho. Presença de adenômeros granulosos (g) na derme esponjosa. 64x.

(b) - Notar que os adenômeros granulosos (g) presentes nesta região da derme esponjosa são pouco desenvolvidos e semelhantes àqueles encontrados em outras regiões da pele tanto de machos quanto de fêmeas; epiderme (e) e derme compacta (dc). HE. 256x.

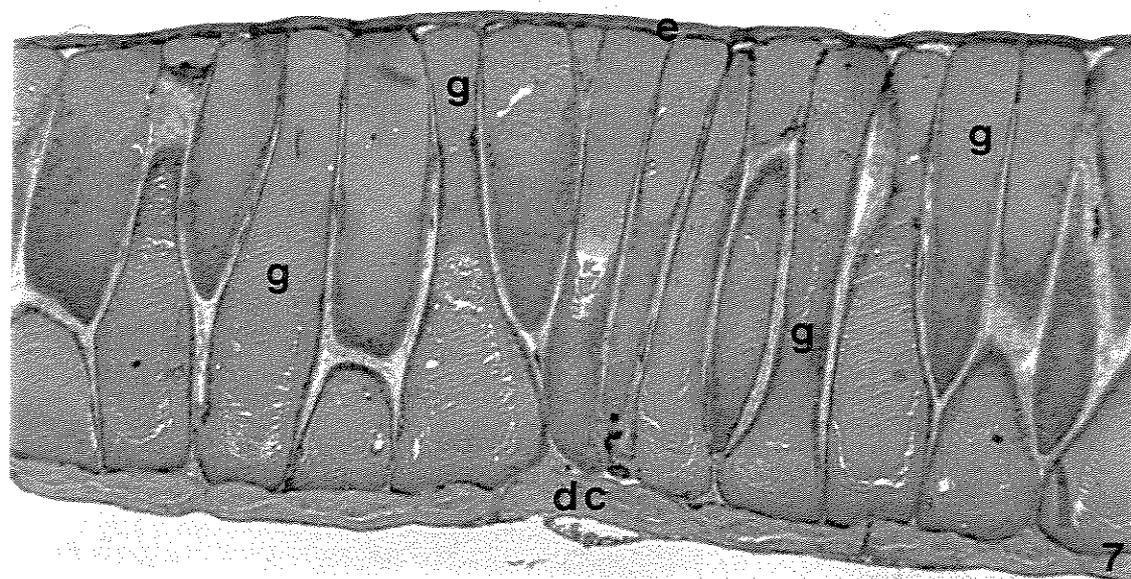
(c) - Observam-se a epiderme (e), derme esponjosa com glândulas granulosas (g) e uma glândula mucosa (m). Em uma das glândulas granulosas e na glândula mucosa pode-se notar o corpo glandular (co), o colo (c) e o ducto intraepidérmico (i). Abaixo da epiderme, vê-se uma camada contínua de melanóforos, que envolve, também, os corpos glandulares (cabeça de seta); derme compacta (dc). HE. 512x.



5



6



7

Fig. 5 — *Cycloramphus dubius* (macho jovem) - Corte longitudinal mostrando a organização histológica da **glândula inguinal**: epiderme (e), derme esponjosa ou superficial contendo numerosos adenômeros granuloso agrupados compactamente (g) e derme compacta (dc). HE. 64x.

Fig. 6 — *Cycloramphus dubius* (macho adulto sem prole) - Notar que os adenômeros granuloso (g) que compõem a **glândula inguinal** mostram-se mais desenvolvidos do que àqueles presentes na foto anterior; epiderme (e), derme compacta (dc), hipoderme (h) com vasos sanguíneos (v). HE. 64x.

Fig. 7 — *Cycloramphus dubius* (macho adulto com prole) - Nesta fotomicrografia fica evidente que os adenômeros granuloso da **glândula inguinal** estão, ainda, mais desenvolvidos do que àqueles presentes nas duas fotos anteriores; epiderme (e), derme compacta (dc). HE. 64x.

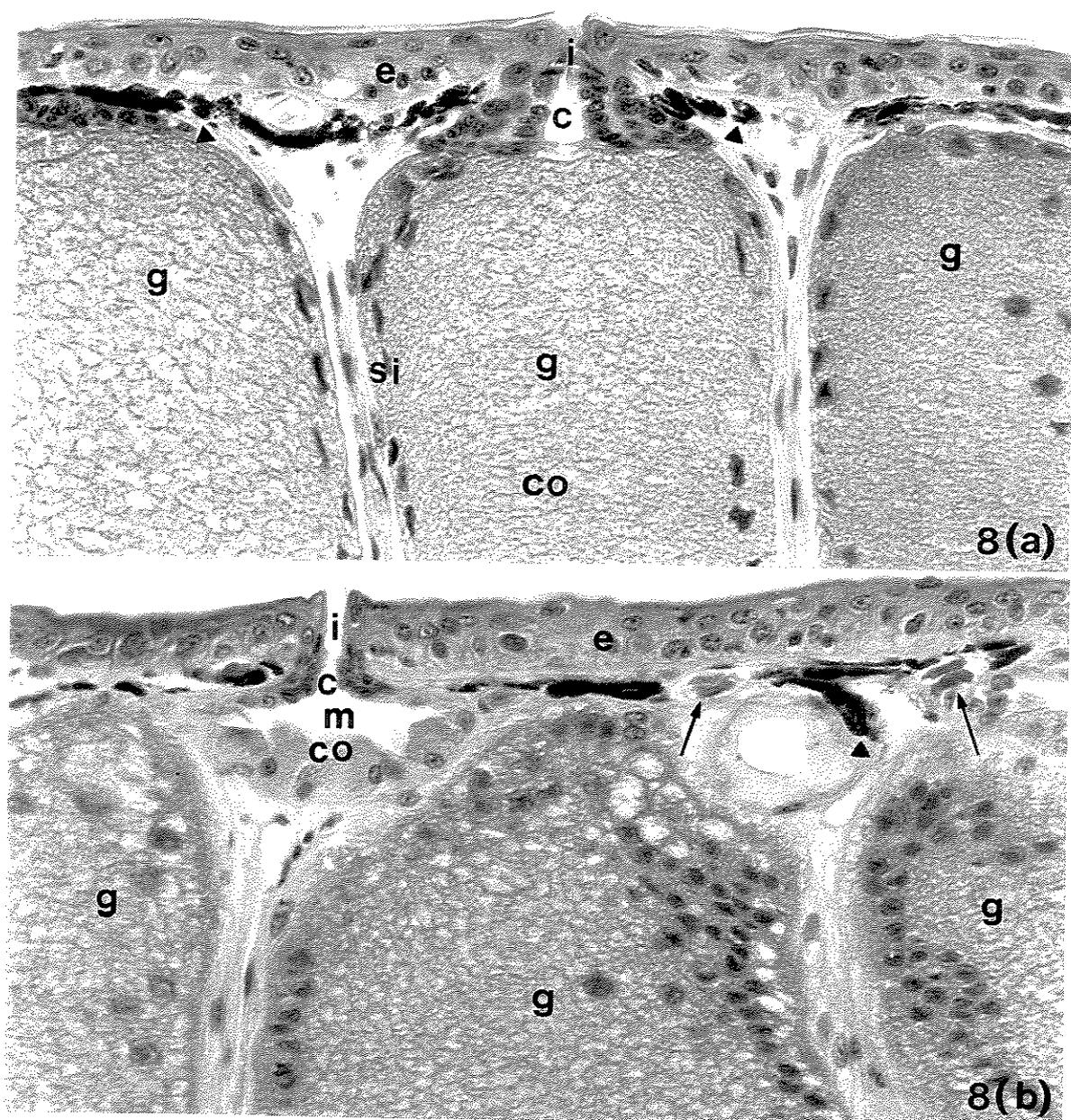


Fig. 8 — *Cycloramphus dubius* (macho adulto com prole) - Glândula inguinal

(a) - Epiderme (e) e parte superior da derme frouxa ou superficial, contendo adenômeros granuloso (g). Observa-se a camada de melanóforos (cabeça de seta), um adenômero granuloso exibindo o ducto intraepidérmico (i), o colo (c) e parte do corpo glandular (co), este último apresenta-se revestido por uma única camada sincicial de células pavimentosas (si) que delimita uma luz totalmente preenchida por grânulos esféricos e eosinofílicos. HE. 512x.

(b) - Epiderme (e) e parte superior da derme esponjosa ou superficial - Logo abaixo da epiderme observa-se uma camada contínua de melanóforos (cabeça de seta); a derme superficial exhibe as porções superiores de três adenômeros granuloso (g) e de um adenômero mucoso (m), este último com corpo glandular (co), colo ou região intercalar (c) e ducto intraepidérmico (i). Notar capilares sanguíneos (setas) junto à junção dermo-epidérmica. HE. 512x.

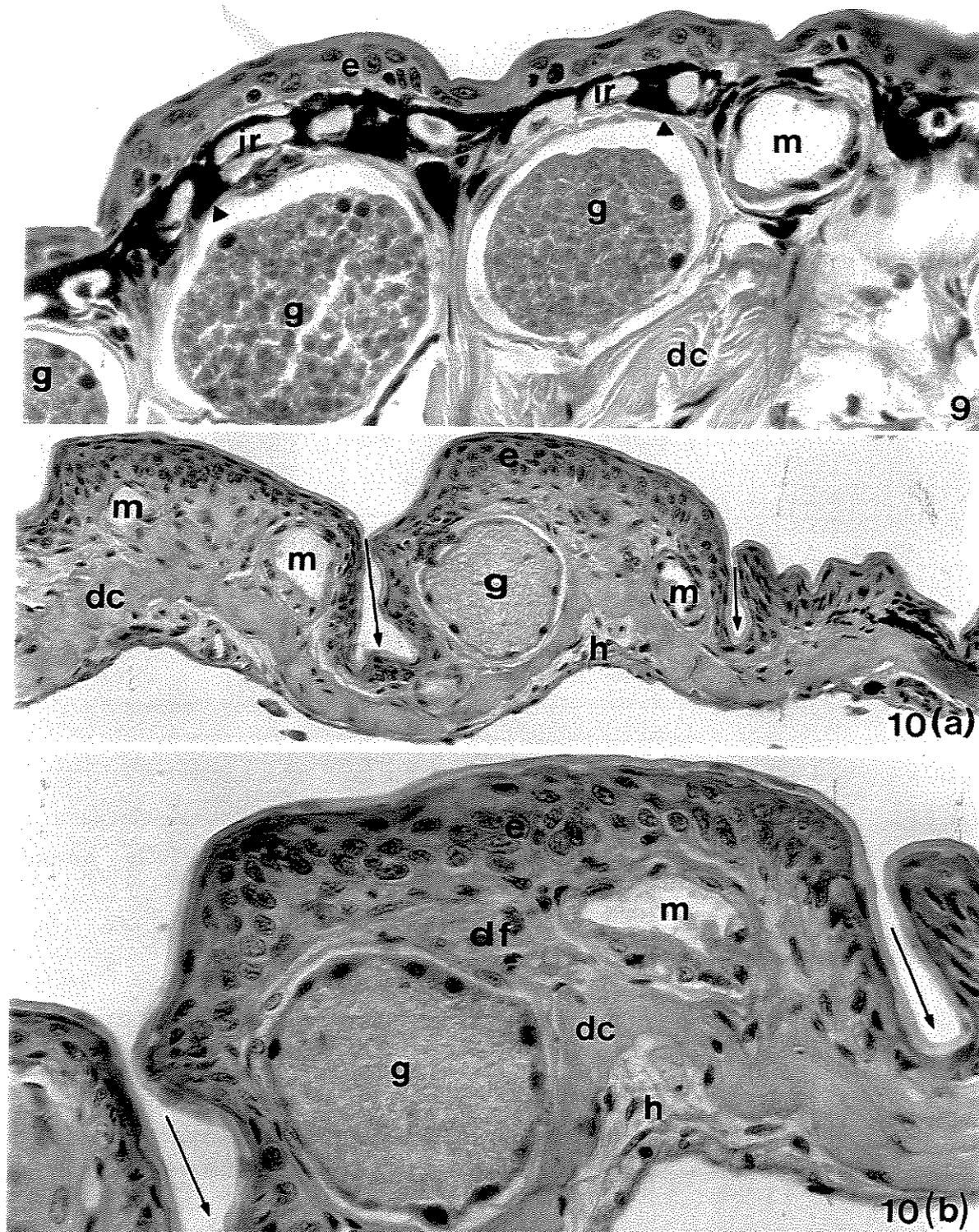


Fig. 9 — *Scinax hiemalis* - Pele dorsal: epiderme (e), derme frouxa contendo corpos de glândulas granulosas (g) e uma mucosa (m); derme compacta (dc). Logo abaixo da epiderme vê-se uma camada contínua de melanóforos (cabeça de seta), e iridóforos (ir). HE. 512x.

Fig. 10 — *Scinax hiemalis* - Pele ventral

(a) - Vista panorâmica: epiderme (e); derme esponjosa contendo glândulas mucosas (m), e uma glândula granulosa; derme compacta (dc); hipoderme (h). Observar que a pele ventral apresenta dobras (setas). HE. 256x.

(b) - Epiderme constituída por maior número de camadas celulares que a pele dorsal (e); derme frouxa (df); glândula granulosa (g); glândula mucosa (m); derme compacta (dc); hipoderme (h). Observar as dobras da epiderme (setas). HE. 512x.

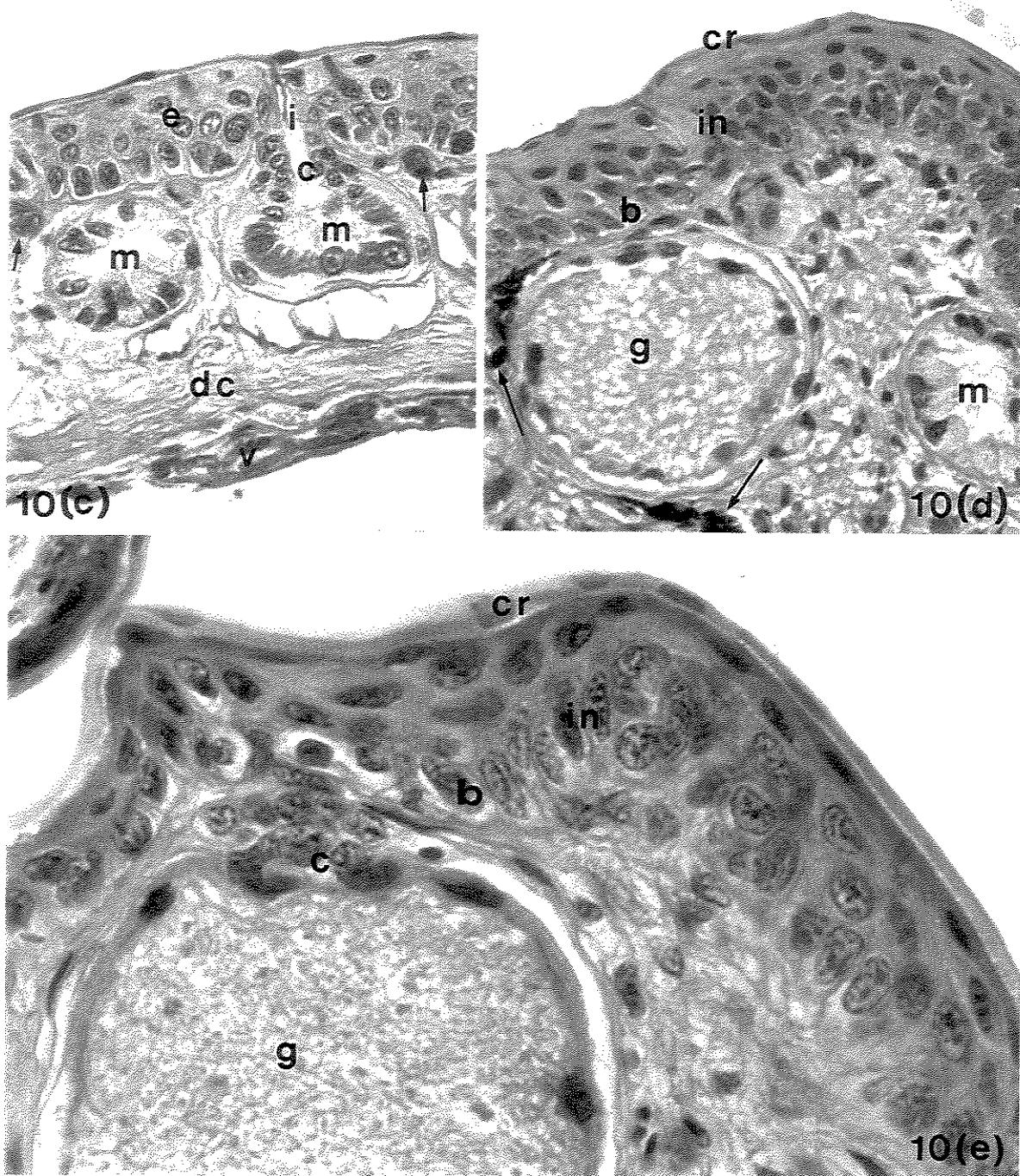


Fig. 10 — *Scinax hiemalis* - **Pele ventral** (continuação)

(c) - Epiderme (e), derme esponjosa ou frouxa com corpos de glândulas mucosas (m); em uma das glândulas observa-se o colo (c) e o ducto intraepidémico (i); derme compacta (dc) e hipoderme com vaso sangüíneo (v). Notar, ainda, vênulas logo abaixo da epiderme (setas). Tricrômico de Masson. 512x.

(d) - Epiderme com os estratos basal (b), intermédio (in) e córneo (cr); derme esponjosa com glândula granulosa (g) e mucosa (m). Observar a escassez de melanóforos (setas). HE. 512x.

(e) - Epiderme em maior aumento com seus diferentes estratos: basal (b), intermédio (in) e córneo (cr). Observar na derme superficial, o corpo de uma glândula granulosa (g) com seu colo glandular (c). HE. 1024x.

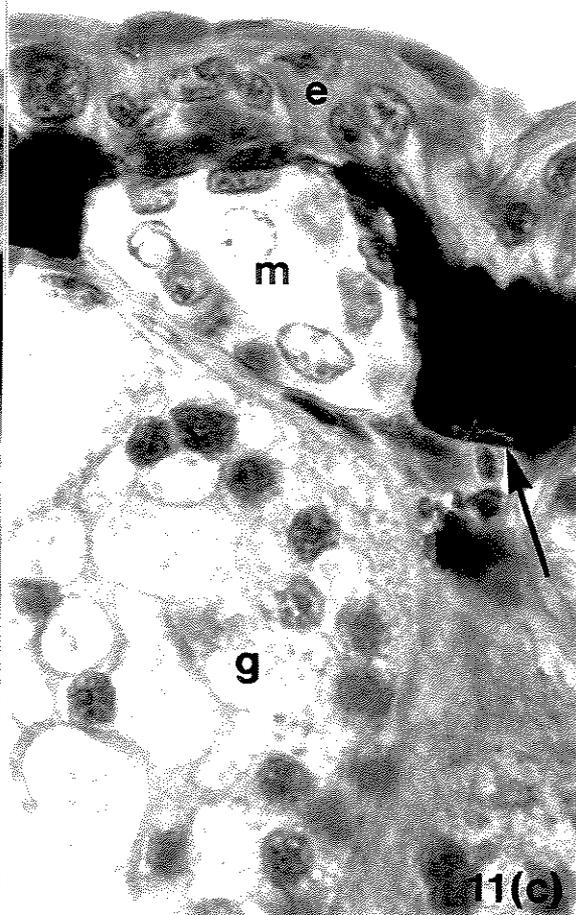
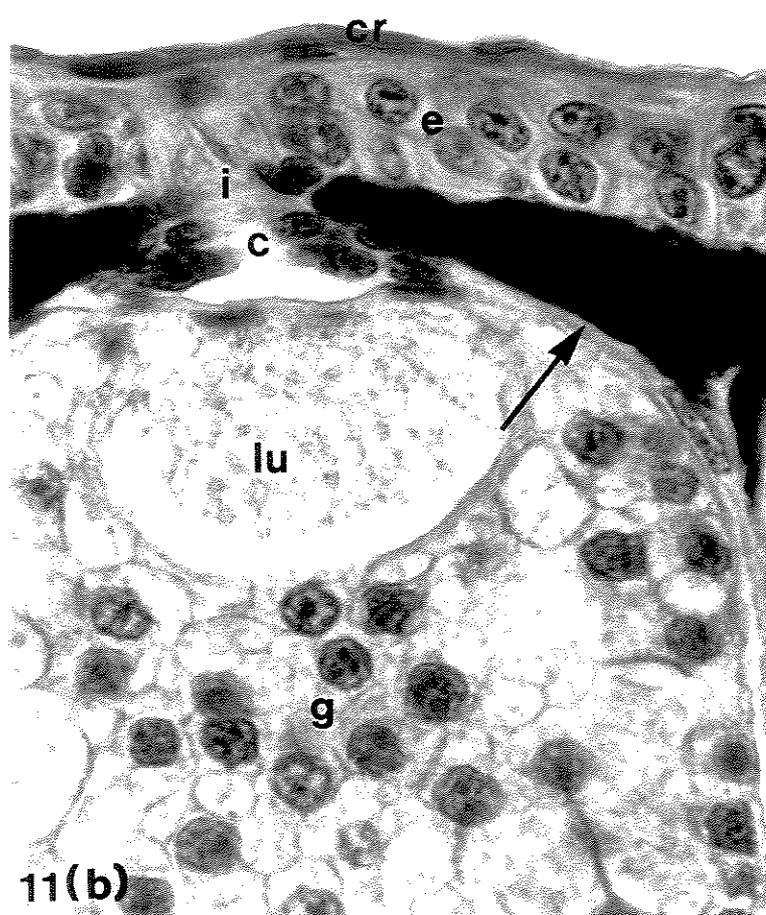
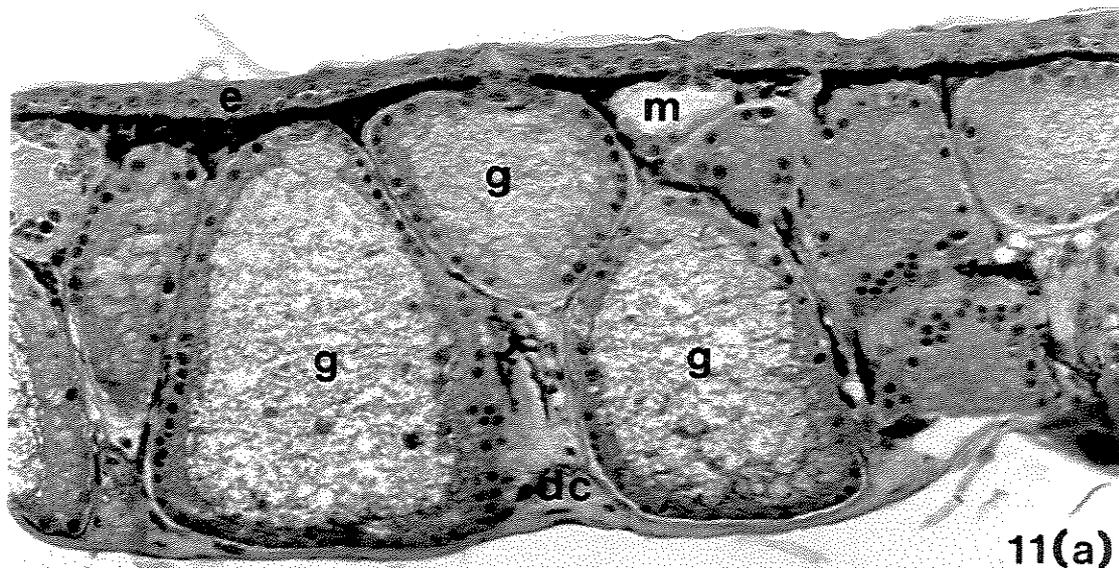


Fig. 11 — *Scinax hiemalis* - Glândula ventro sacral (macho adulto)

(a) - Corte longitudinal mostrando a organização histológica da glândula ventro-sacral (macho adulto): epiderme (e), derme frouxa contendo muitas glândulas granulosas agrupadas compactamente (g) e uma glândula mucosa situada superficialmente a esta derme (m); derme compacta (dc). HE. 256x.

(b) - Epiderme (e) e porção superior de uma glândula granulosa (g): mostrando o estrato córneo (cr), ducto intraepidérmico (i), colo (c); lúmen glandular (lu) preenchido com grânulos esféricos. Melanóforos (seta). HE. 1024x.

(c) - Epiderme (e); derme superficial apresentando um adenômero mucoso (m), o qual fica esparsos e restrito logo abaixo à epiderme, também, pode ser observado parte do corpo de um adenômero granuloso (g). Na transição epiderme-derme evidenciam-se melanóforos (seta). HE. 1024x.

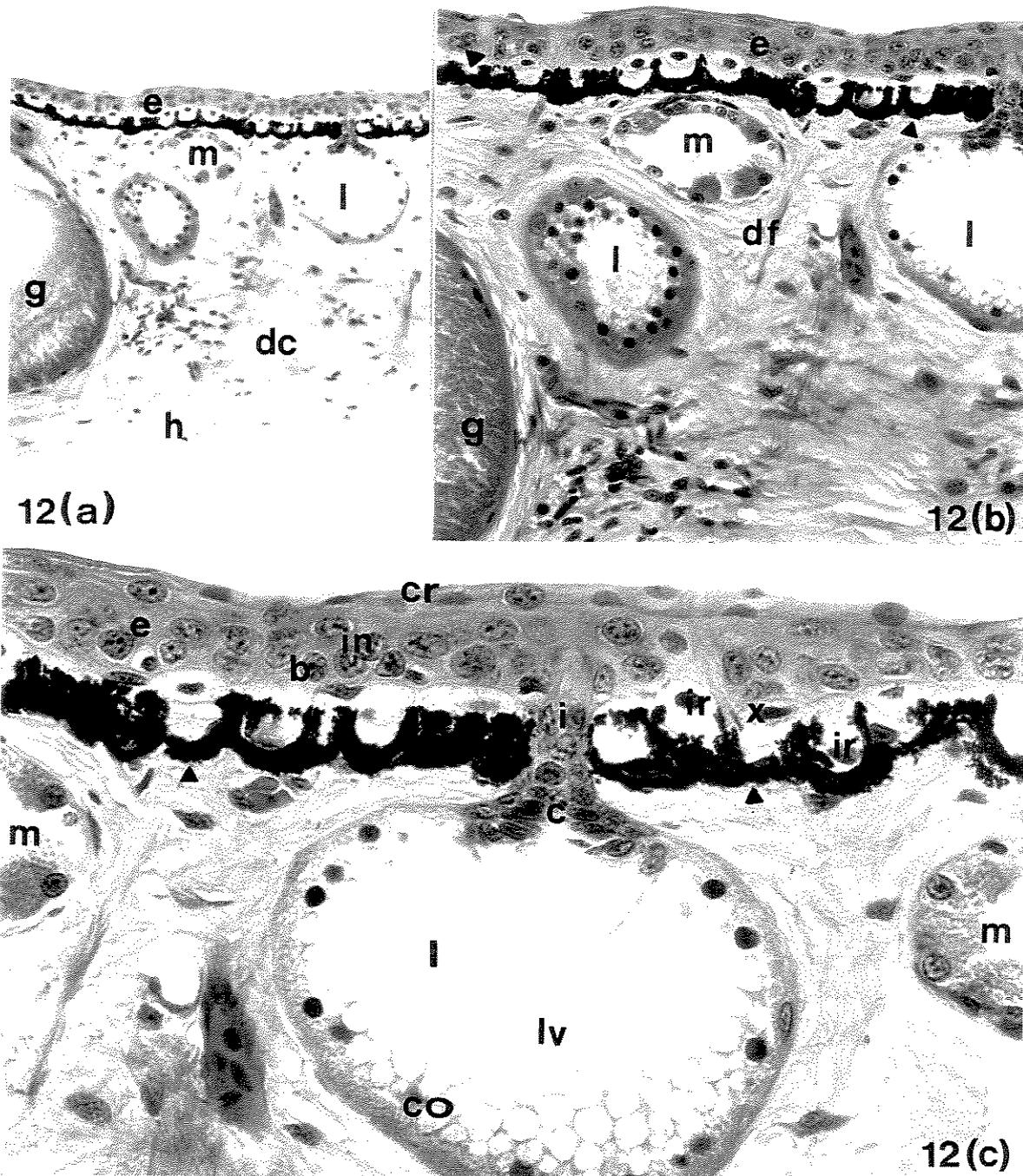


Fig. 12 — *Phyllomedusa burmeisteri* (macho adulto) - Pele dorsal

(a) - Observam-se a epiderme (e), derme frouxa exibindo glândulas de três tipos distintos — glândula granulosa (g), glândula mucosa (m) e glândula lipídica (l); derme compacta (dc) e hipoderme (h). HE. 128x.

(b) - Epiderme (e); derme frouxa (df) contendo duas glândulas lipídicas (l), uma glândula mucosa (m) e parte de uma glândula granulosa (g). Abaixo da epiderme, nota-se uma camada contínua de melanóforos exibindo citoplasma preenchido por pigmento negro (cabeça de seta). HE. 256x.

(c) - Esta figura mostra “em detalhe” uma glândula lipídica (l) e a unidade cromatofórica com seus três elementos: melanóforos (cabeça de seta), iridóforos (ir) e xantóforos (x). Notar que a glândula lipídica é constituída por um corpo glandular (co) revestido por uma única camada de células cúbicas que delimita uma luz contendo estruturas vacuolares (lv), um colo (c) e um ducto intraepidérmico (i); na epiderme (e) evidenciam-se os estratos: basal (b), intermédio (in) e córneo (cr). HE. 512x.

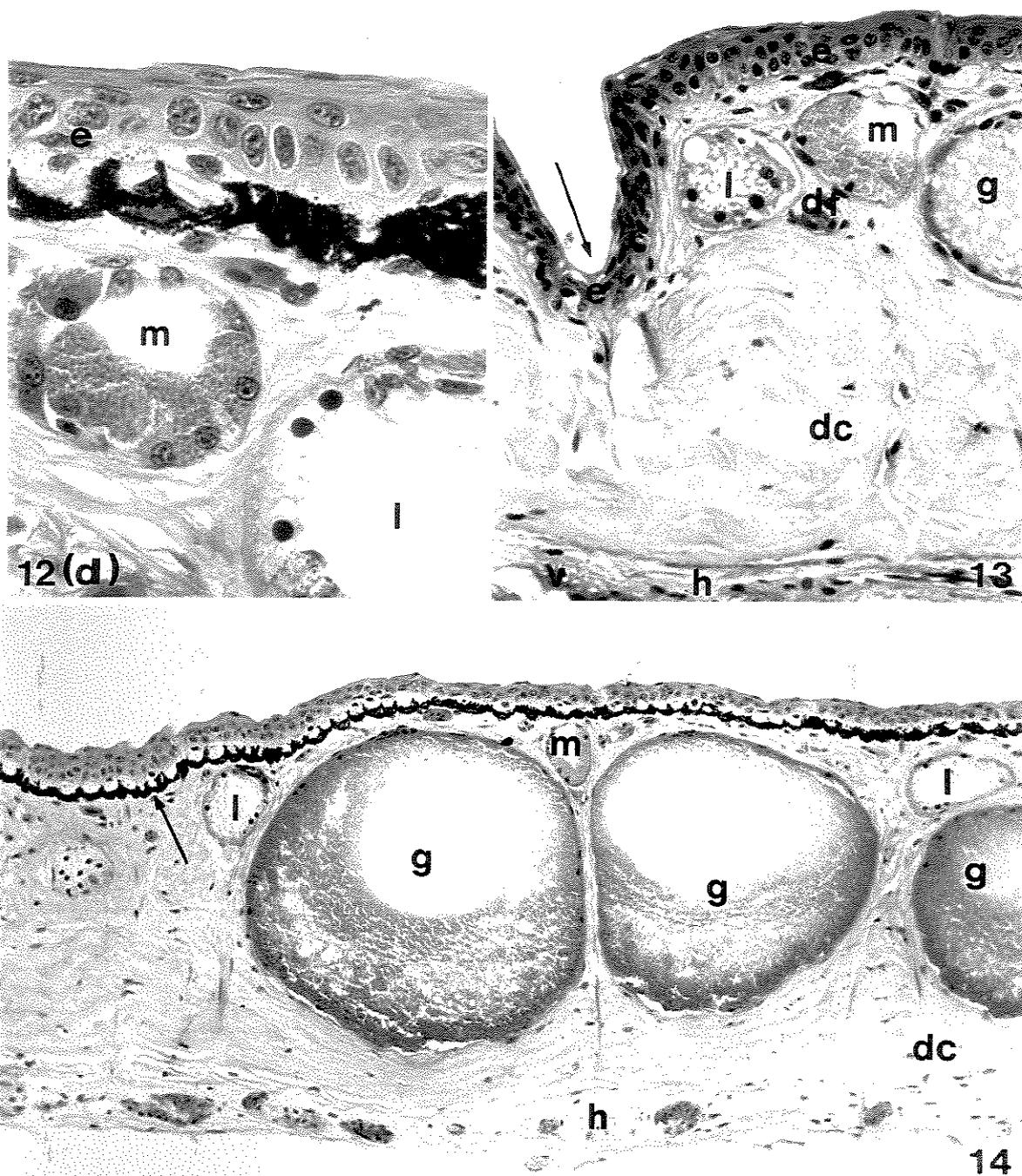


Fig. 12 — (Continuação)

(d) - *Phyllomedusa burmeisteri* (macho adulto) - Pele dorsal. Observar uma glândula mucosa (m) constituída por células altas cujo citoplasma apresenta-se repleto de grânulos eosinofílicos; o núcleo é esférico e basal; a luz desta glândula apresenta-se vazia; vêem-se, ainda, a epiderme (e) com seus diferentes estratos, a unidade cromatófórica (cabeça de seta) e parte de uma glândula lipídica (l). HE. 512x.

Fig. 13 — *Phyllomedusa burmeisteri* (macho adulto) - Pele ventral. Notar a reentrância (seta) na superfície da pele, a epiderme (e), a derme frouxa (df) ocupada por glândulas: mucosa (m), lipídica (l) e granulosa (g), a derme compacta (dc) e a hipoderme (h). HE. 256x.

Fig. 14 — *Phyllomedusa burmeisteri* (macho adulto) - Pele dorsal. Notar a unidade cromatófórica (seta) e as glândulas: granulosas (g), lipídicas (l) e a mucosa (m), derme compacta (dc) e hipoderme (h). HE. 128x.

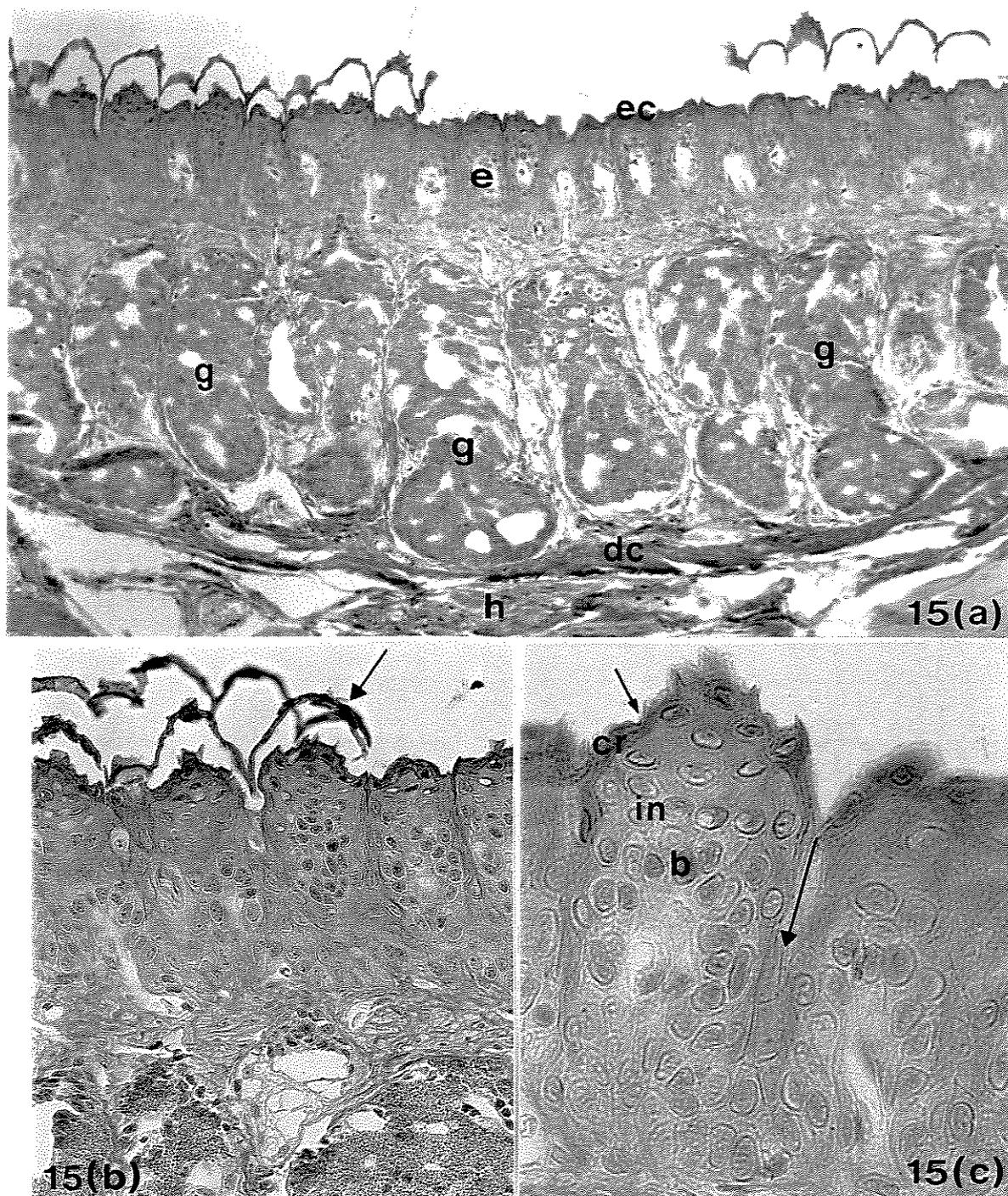


Fig. 15 — *Phyllomedusa burmeisteri* (macho adulto) - Coxin nupcial

- (a) - Notar a epiderme (e) muito espessa com espículas córneas (ec), derme frouxa é ocupada por adenômeros granulados alongados (g) e agrupados de maneira compacta como nas glândulas inguinal e ventro-sacral; esses adenômeros repousam sobre uma derme compacta (dc) que apoia-se sobre a hipoderme (h). Tricrômico de Masson. 128x.
- (b) e (c) - Detalhe da epiderme constituída pelos estratos: basal (b), intermédio com várias camadas de células (in) e córneo (cr). A epiderme possui saliências (seta menor) e reentrâncias (seta maior). Tricrômico de Masson. 256x (b) e 512x (c).

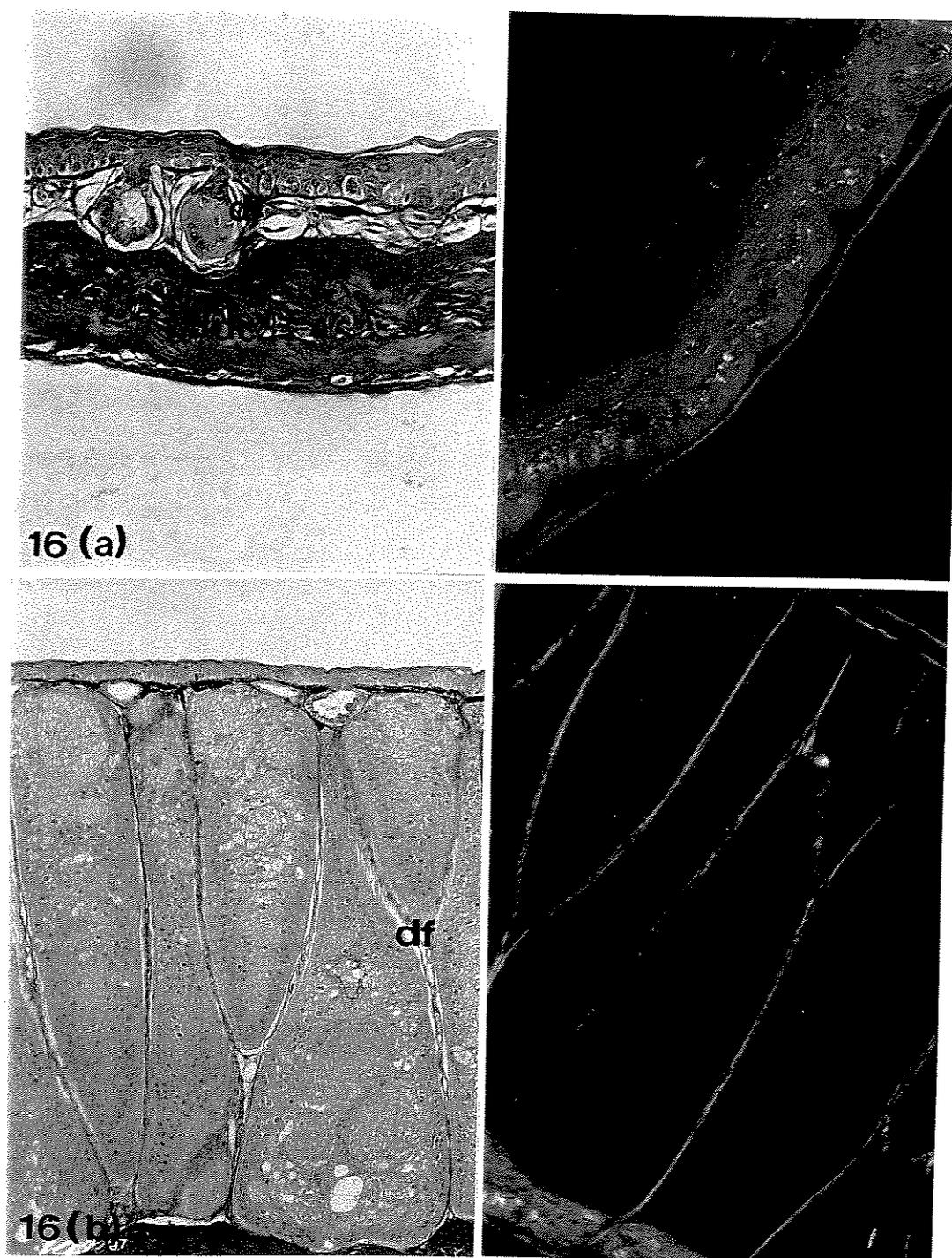


Fig. 16 — Observar para: *Cycloramphus dubius*, *Scinax hiemalis* e *Phyllomedusa burmeisteri*, o arranjo das fibras colágenas na derme frouxa (df) e na derme compacta (dc). As estruturas das fotomicrografias localizadas à esquerda foram coradas pelo **Picrossirius-hematoxilina**. À direita de cada fotomicrografia, observam-se as mesmas estruturas submetidas à **polarização**, evidenciando, com isso, a birrefringência das fibras colágenas.

(a) - *Cycloramphus dubius*. Pele dorsal. 128x

(b) - *Cycloramphus dubius*. Glândula inguinal. 128x.

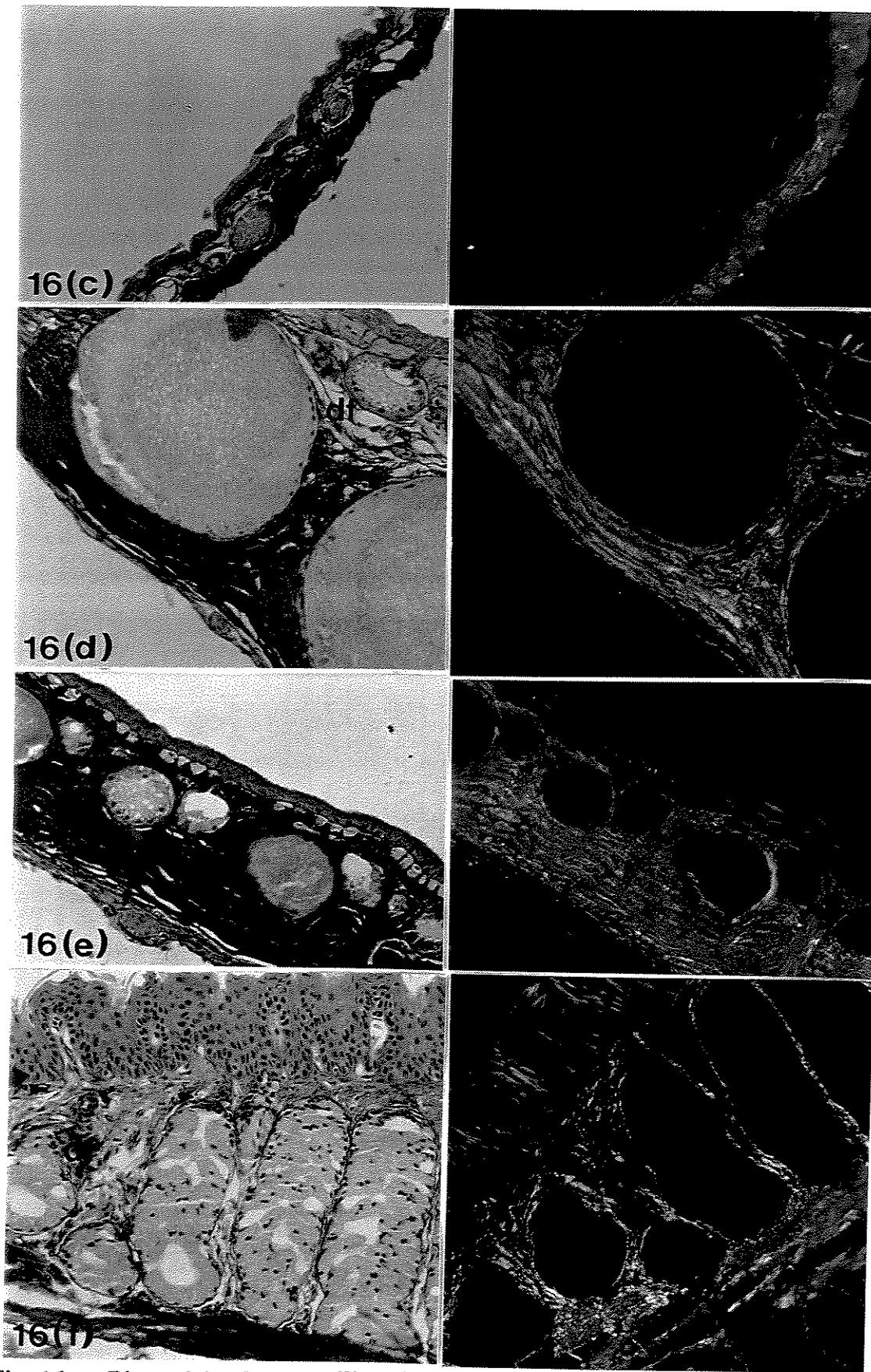


Fig. 16 — Picrossirius-hematoxilina (continuação)

(c) - *Scinax hiemalis*. Pele dorsal. 128x

(d) - *Phyllomedusa burmeisteri*. Pele dorsal. 128x.

(e) - *Phyllomedusa burmeisteri*. Pele ventral. 128x.

(f) - *Phyllomedusa burmeisteri*. Coxin nupcial. 128x.

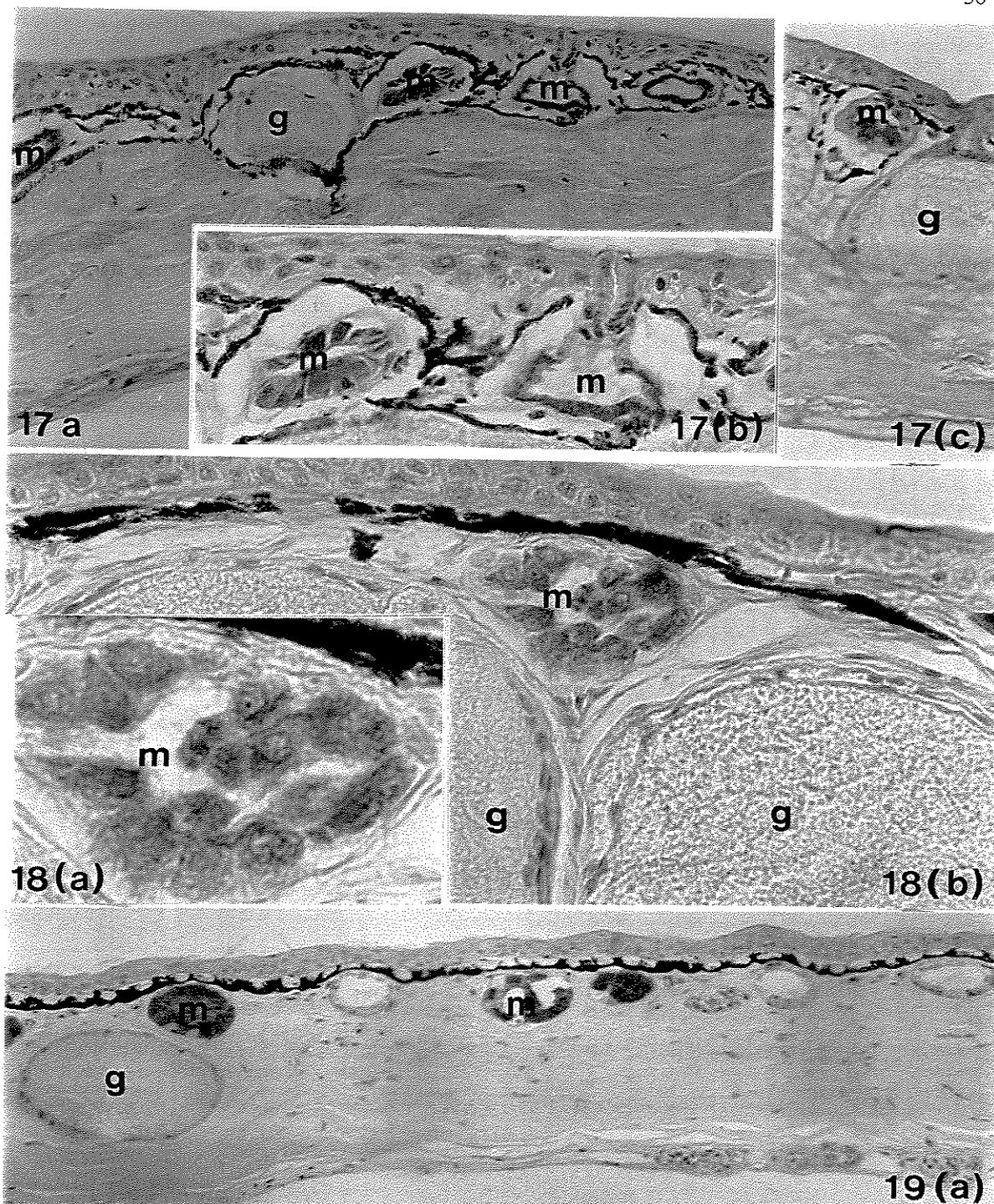


Fig. 17 — *Cycloramphus dubius*. Pele dorsal. Reação histoquímica para PAS (mucossubstâncias neutras).

(a) - Observar na derme frouxa quatro glândulas mucosas com reação positiva (m) e uma glândula granulosa com reação negativa (g). 256x.

(b) - Trata-se da mesma figura anterior em maior aumento. 512x.

(c) - Contraste entre uma glândula mucosa com reação positiva (m) e uma glândula granulosa com reação negativa (g). 256x.

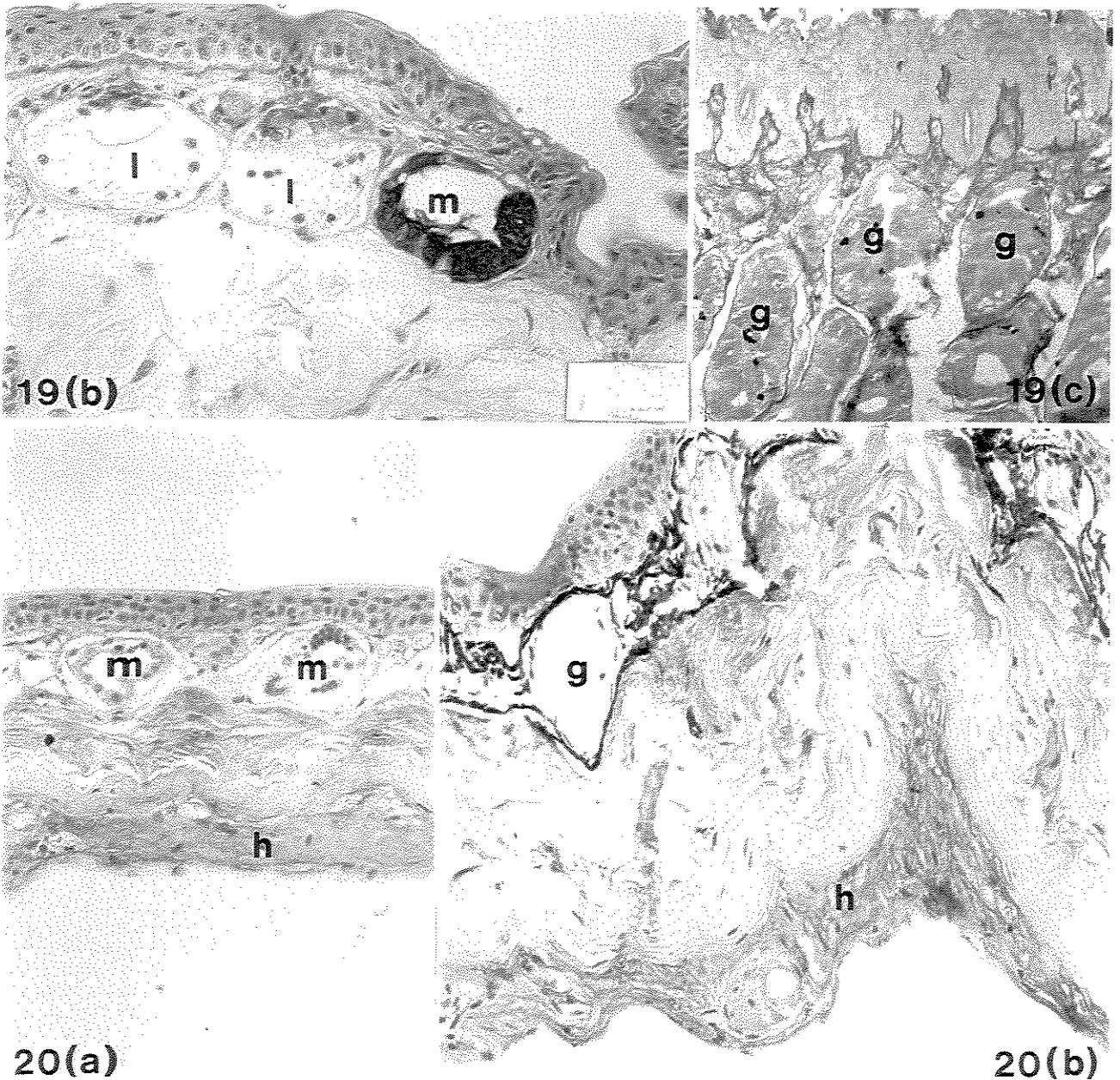
Fig. 18 — *Cycloramphus dubius*. Glândula inguinal PAS.

(a) - Observar uma glândula mucosa com reação positiva em detalhe (m). 1024x.

(b) - Observar a mesma glândula mucosa da figura anterior em menor aumento (m), acompanhada por duas glândulas granulosas com reação negativa (g). 512x.

Fig. 19 — *Phyllomedusa burmeisteri*. PAS.

(a) - Pele dorsal: evidenciam-se glândulas mucosas com reação positiva (m), e uma glândula granulosa com reação negativa (g). 256x.



(b) - *Phyllomedusa burmeisteri* - **Pele ventral** (continuação). Notar uma glândula mucosa com reação PAS fortemente positiva (m) e duas glândulas lipídicas (l). 256x.
 (c) - *Phyllomedusa burmeisteri* - **Coxin nupcial**: mostrando a reação negativa para PAS nos adenômeros granulosos (g). 256x.

Fig. 20 — *Cycloramphus dubius*. Reação histoquímica para Azul de Alcian (AB) em pH 2,5 (mucossubstâncias ácidas).

(a) - **Pele ventral**. Observar hipoderme com reação positiva (h) e glândulas mucosas com reação negativa (m). 256x.

(b) - **Pele dorsal**. Nesta figura evidenciam-se a hipoderme com reação positiva (h) e uma glândula granulosa com reação negativa (g). 512x.

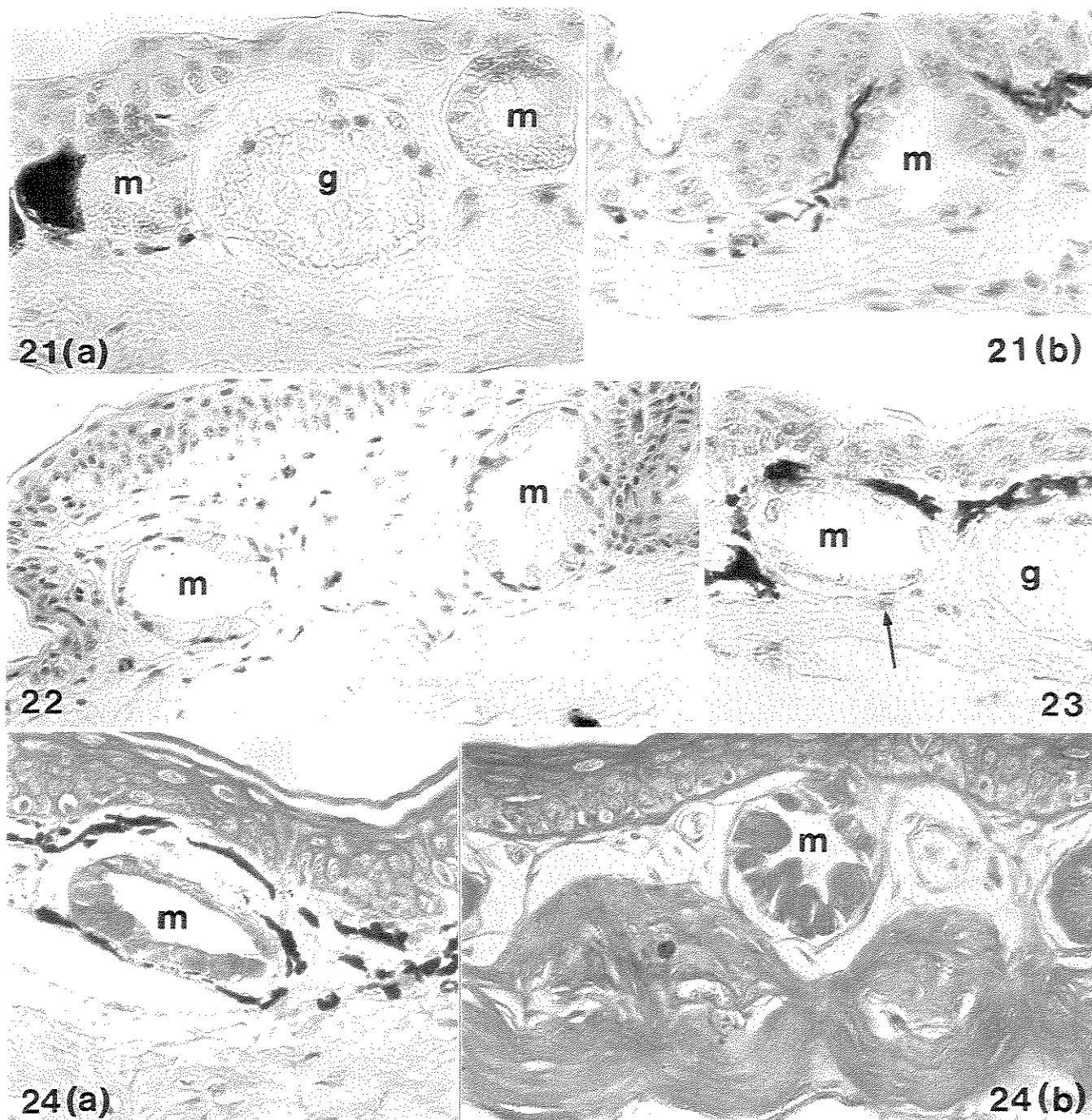


Fig. 21 — *Scinax hiemalis*. Reação histoquímica para AB em pH 2,5

(a) - **Pele dorsal**: observar duas glândulas mucosas com reação moderadamente positiva (m) e uma glândula granulosa com reação negativa (g). 256x.

(b) - **Pele ventral**: nota-se, em detalhe, uma glândula mucosa com reação moderadamente positiva (m). 256x.

Fig. 22 — *Phyllomedusa burmeisteri*. **Pele ventral**. AB pH 2,5. Na derme frouxa observam-se duas glândulas mucosas com reação moderadamente positiva (m). 256x.

Fig. 23 — *Cycloramphus dubius*. **Pele dorsal**. Observar que com AB em pH 0,5 coram-se somente os mastócitos (seta) e a glândula mucosa (m) e a glândula granulosa (g) mostram reação negativa. 256x.

Fig. 24 — Reação histoquímica para ninhidrina-Schiff (proteínas)

(a) - *Cycloramphus dubius*. **Pele dorsal** - glândula mucosa com reação moderadamente positiva (m). 512x.

(b) - *Cycloramphus dubius*. **Pele ventral** - glândula mucosa com reação moderadamente positiva (m). 512x.

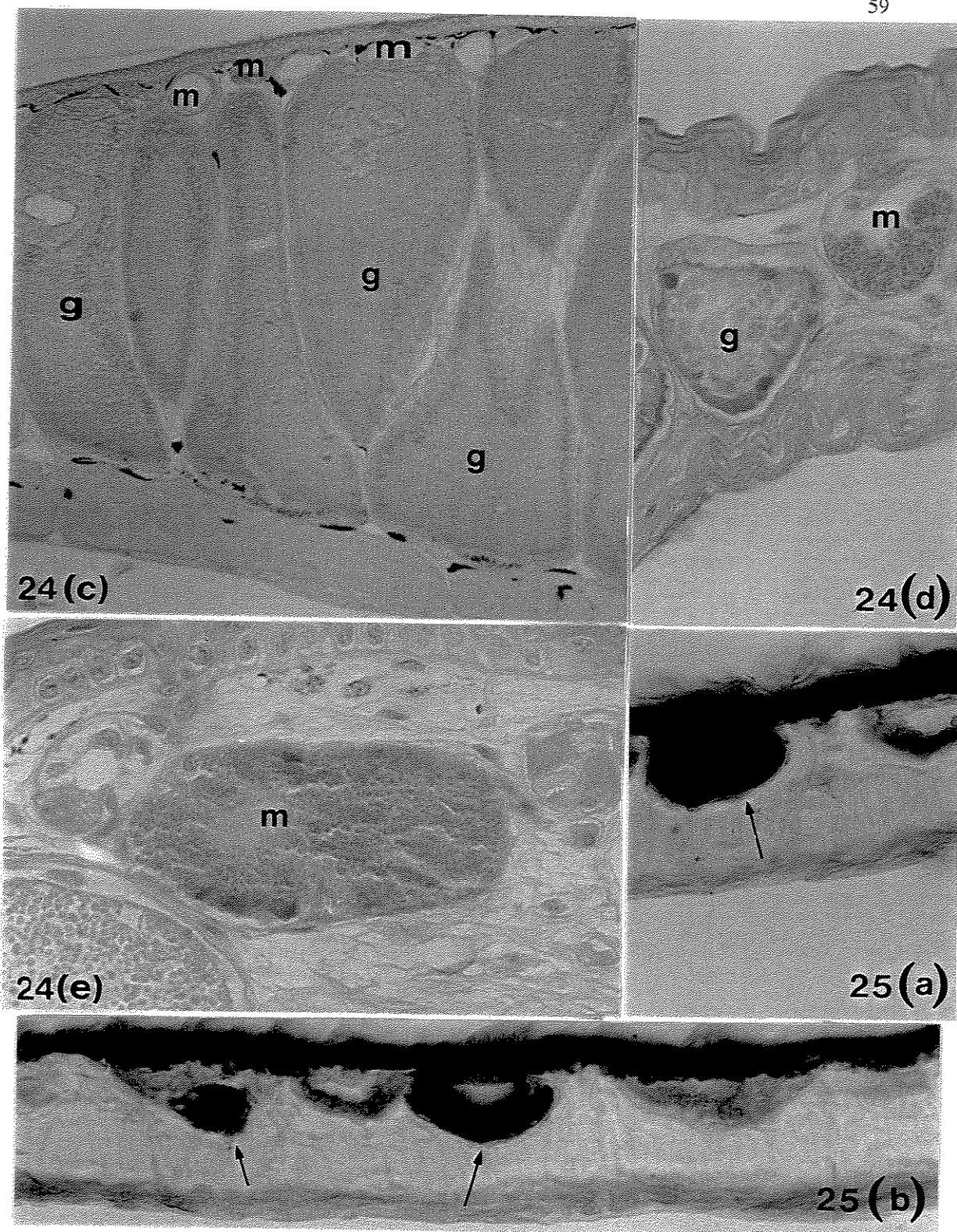


Fig. 24 — ninhydrina-Schiff (continuação)

(c) - *Cycloramphus dubius* - glândula inguinal - adenômeros granuloso (g) e mucoso (m) apresentando reação moderadamente positiva. 128x.

(d) - *Scinax hiemalis* - pele ventral - glândula granulosa (g) e glândula mucosa (m) com reação moderadamente positiva. 512x.

(e) - *Phyllomedusa burmeisteri* - pele ventral - glândula mucosa com reação moderadamente positiva (m). 512x.

Fig. 25 — Reação histoquímica para Sudan-black (lipídios)

(a) - *Phyllomedusa burmeisteri*. Pele dorsal - glândula lipídica com reação positiva (seta)

(b) - *Phyllomedusa burmeisteri*. Pele ventral - glândulas lipídicas com reação positiva (setas)

7 — TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1 — Reações Histoquímicas para Glândulas Mucosas e Granulosas presentes na Pele Dorsal, Pele Ventral e na Glândula Cutânea Sexualmente Dimórfica das 3 espécies de anuros.

ESPÉCIES	PAS						AB (2,5)						AB (0,5)						NS						
	GM			GG			GM			GG			GM			GG			GM			GG			
	PD	PV	G	PD	PV	GD	PD	PV	GD	PD	PV	GD	PD	PV	GD	PD	PV	GD	PD	PV	GD	PD	PV	GD	
<i>C. dubius</i>	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. hiemalis</i>	+++	+++	+++	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. burmeisteri</i>	+++	+++	*	-	-	-	++	++	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

GM= glândula mucosa; **GG**= glândula granulosa; **PD**= pele dorsal; **PV**= pele ventral; **GD**= glândula cutânea sexualmente dimórfica. (-) reação negativa; (+) reação fracamente positiva; (++) reação moderadamente positiva; (+++) reação fortemente positiva. * (ausente — esta espécie não apresenta adênômeros mucosos na glândula sexualmente dimórfica).

TABELA II — Espessura (μm) da pele dorsal (epiderme, derme frouxa e compacta) e hipoderme de *Cycloramphus dubius* (machos e fêmeas), *Scinax hiemalis* (machos e fêmeas) e *Phyllomedusa burmeisteri* (macho).

ESPÉCIES	EPID.	D.F.	D.C.	D.F. + D.C.	HIPO.
<i>C. dubius</i> (machos)	21,1	45,1	88,5	—	35,8
<i>S. hiemalis</i> (machos)	19,7	57,5	17,3	—	4,30
<i>P. burmeisteri</i> (macho)	26,2	—	—	218,8	25,7
<i>C. dubius</i> (fêmeas)	19,5	36,0	101,5	—	44,0
<i>S. hiemalis</i> (fêmeas)	15,2	46,1	29,3	—	5,00

Média de seis machos (3 adultos e 3 juvenis) e três fêmeas para *Cycloramphus dubius*, três machos (adultos) e três fêmeas para *Scinax hiemalis*, e um único macho (adulto) para *Phyllomedusa burmeisteri* (média de 10 regiões distintas da pele dorsal).

* EPID.=epiderme D.F.=derme frouxa D.C.=derme compacta HIPO=hipoderme

TABELA III — Espessura (μm) da pele ventral (epiderme, derme frouxa e compacta) e hipoderme de *Cycloramphus dubius* (machos e fêmeas), *Scinax hiemalis* (machos e fêmeas), e *Phyllomedusa burmeisteri* (macho).

ESPÉCIES	EPID.	D.F.	D.C.	D.F. + D.C.	HIPO.
<i>C. dubius</i> (machos)	23,5	44,1	89,4	—	25,3
<i>S. hiemalis</i> (machos)	23,7	50,7	17,7	—	6,30
<i>P. burmeisteri</i> (macho)	33,1	—	—	296,2	28,5
<i>C. dubius</i> (fêmeas)	27,1	40,5	61,2	—	30,6
<i>S. hiemalis</i> (fêmeas)	25,1	51,3	18,6	—	5,20

Média de seis machos (3 adultos e 3 juvenis) e três fêmeas para *Cycloramphus dubius*, três machos (adultos) e três fêmeas para *Scinax hiemalis*, e um único macho (adulto) para *Phyllomedusa burmeisteri* (média de 10 regiões distintas da pele ventral).

* EPID.=epiderme D.F.=derme frouxa D.C.=derme compacta HIPO=hipoderme

TABELA IV — Espessura (μm) da região da glândula cutânea sexualmente dimórfica (epiderme, derme frouxa e compacta) e hipoderme de *Cycloramphus dubius* (machos adultos e juvenis), *Scinax hiemalis* (machos) e *Phyllomedusa burmeisteri* (macho).

ESPÉCIES	EPIDERME	D.F.	D.C.	HIPO.
<i>C. dubius</i> (machos adultos)	20,7	862,3	70,6	17,4
<i>C. dubius</i> (machos juvenis)	21,3	496,3	77,1	22,9
<i>S. hiemalis</i> (machos adultos)	17,6	621,7	15,3	5,20
<i>P. burmeisteri</i> (macho adulto)	113,1	332,5	31,9	15,2

Média de seis machos (3 adultos e 3 juvenis) para *Cycloramphus dubius*, três machos (adultos) para *Scinax hiemalis*, e três machos (adultos) para *Phyllomedusa burmeisteri*.

* D.F.=derme frouxa D.C.=derme compacta HIPO=hipoderme

TABELA V - Diâmetro maior (μm) dos Adenômeros Mucosos presentes na pele dorsal, ventral e na glândula dimórfica de *Cycloramphus dubius*, *Scinax hiemalis* e *Phyllomedusa burmeisteri*.

Machos Adultos	Pele Dorsal	Pele Ventral	Gl. Dimorf.
<i>C. dubius</i>	56,9	52,2	55,4
<i>S. hiemalis</i>	40,8	41,9	42,4
<i>P. burmeisteri</i>	59,1	74,5	—
Fêmeas	Pele Dorsal	Pele Ventral	Gl. Dimorf.
<i>C. dubius</i>	48,5	47,6	—
<i>S. hiemalis</i>	39,5	42,1	—

Média de seis machos (3 adultos e 3 juvenis) e três fêmeas para *Cycloramphus dubius*, três machos adultos e três fêmeas para *Scinax hiemalis* e, um único macho (adulto) para *Phyllomedusa burmeisteri*.

TABELA VI - Diâmetro maior (μm) dos Adenômeros Granulosos presentes na pele dorsal, ventral e glândula dimórfica de *Cycloramphus dubius*, *Scinax hiemalis* e *Phyllomedusa burmeisteri*.

	Pele dorsal	Pele Ventral	Gl. Dimórfica
<i>C. dubius</i> machos adultos	79,2	70,8	818
<i>C. dubius</i> machos juvenis	61,0	59,6	475
<i>S. hiemalis</i> machos adultos	58,7	60,9	543
<i>P. burmeisteri</i> macho adulto	248	205	256
<i>C. dubius</i> (fêmeas)	78,5	82,3	—
<i>S. hiemalis</i> (fêmeas)	67,2	79,5	—

Média de seis machos (3 adultos e 3 juvenis) e três fêmeas para *Cycloramphus dubius*, três machos e três fêmeas para *Scinax hiemalis*, 1 único macho para *Phyllomedusa burmeisteri* (pele dorsal e ventral), e três machos adultos para *Phyllomedusa burmeisteri* (Glândula Dimórfica- GCSD)

TABELA VII - Diâmetro maior (μm) das Glândulas Lipídicas presentes na pele dorsal e ventral de *Phyllomedusa burmeisteri*.

	PELE DORSAL	PELE VENTRAL
<i>P. burmeisteri</i>	89,0	92,0

Média de 1 único macho extraída de dez regiões distintas para cada local (pele dorsal e ventral).

Gráfico 1. Espessura (μm) da pele dorsal e hipoderme de *C. dubius* machos e fêmeas e de *S. hiemalis* machos e fêmeas

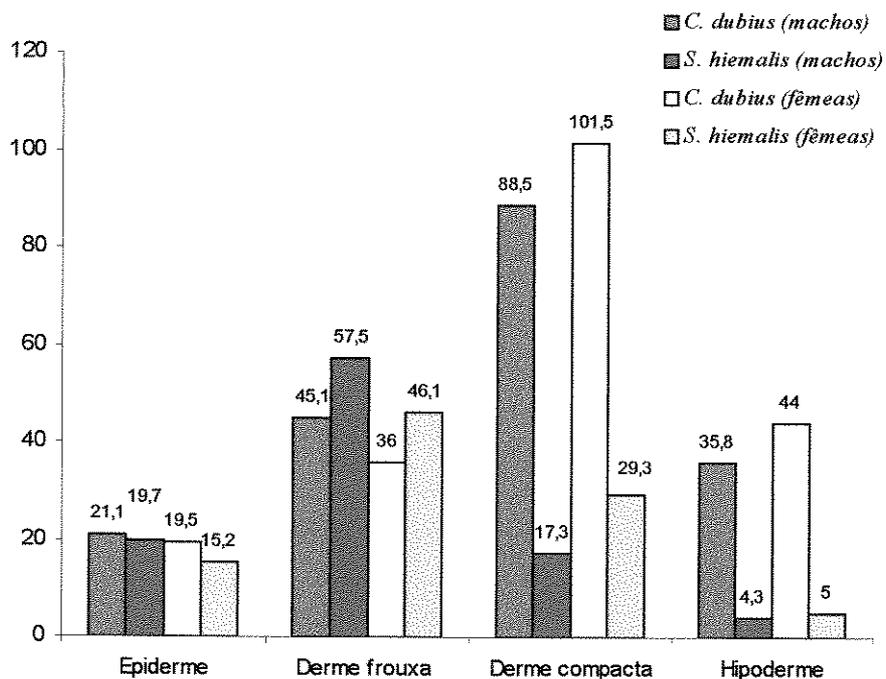


Gráfico 2. Espessura (μm) da pele dorsal e hipoderme de *P. burmeisteri* (macho). DF + DC = Derme frouxa + Derme compacta

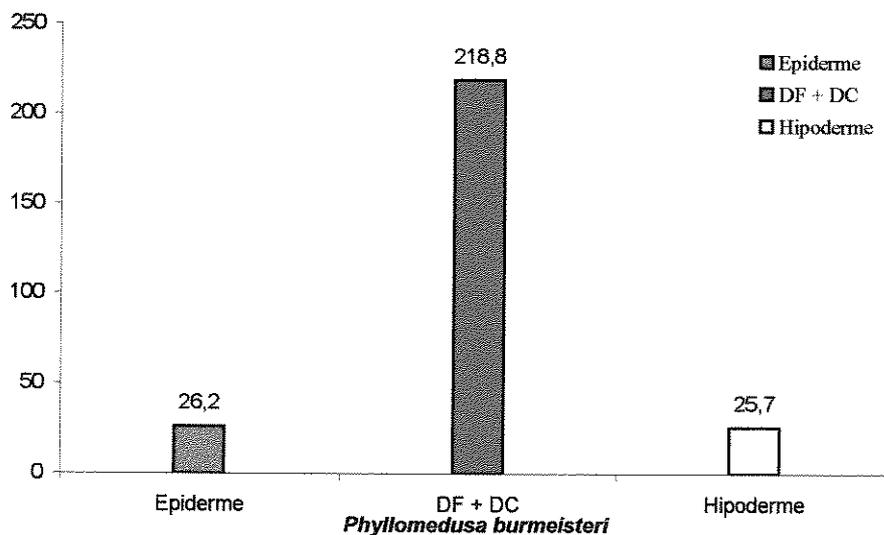


Gráfico 3. Espessura (μm) da pele ventral e hipoderme de *C. dubius* (machos e fêmeas) e de *S. hiemalis* (machos e fêmeas).

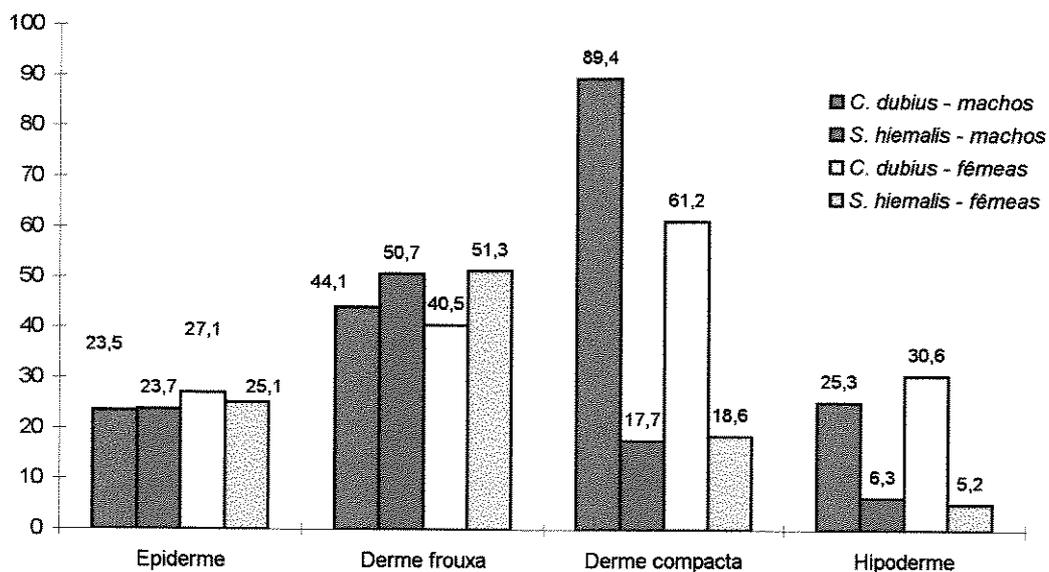


Gráfico 4. Espessura (μm) da pele ventral e hipoderme de *P. burmeisteri* (macho).
DF + DC = Derme frouxa + Derme compacta

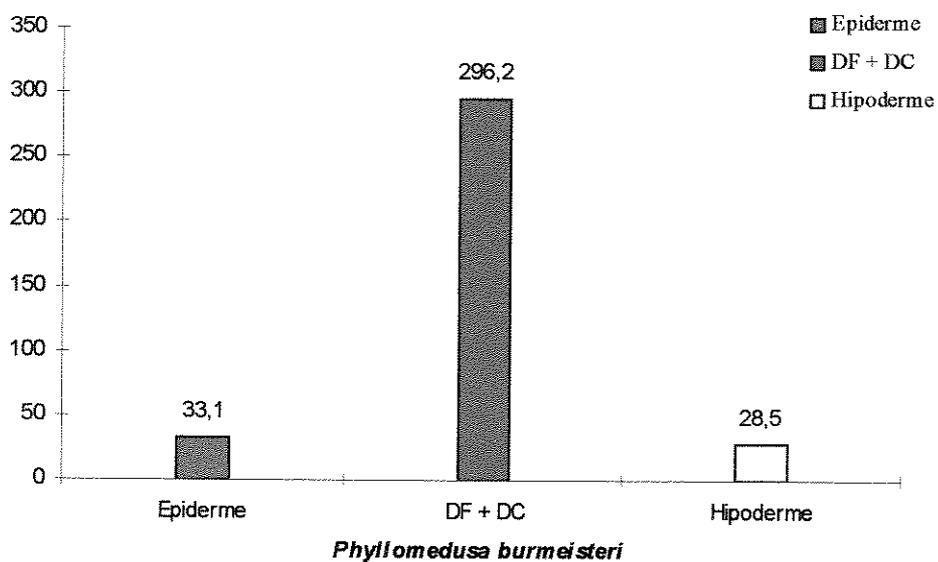


Gráfico 5. Espessura (μm) da região da glândula cutânea sexualmente dimórfica e hipoderme de *C. dubius* (machos adultos e jovens), *S. hiemalis* (machos adultos) e *P. burmeisteri* (macho adulto).

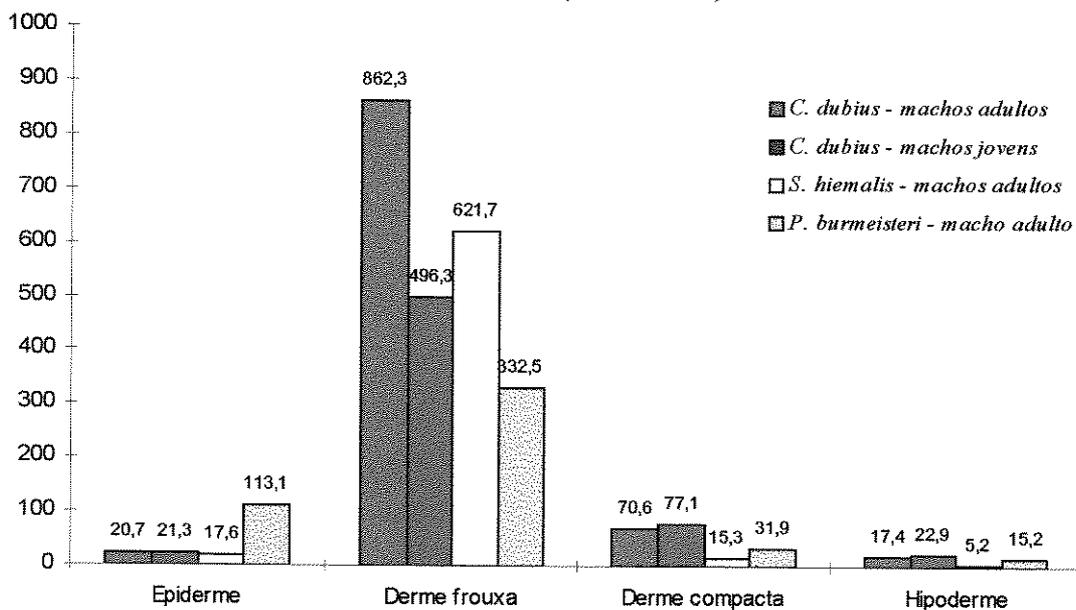


Gráfico 6. Diâmetro maior (μm) das glândulas mucosas presentes na pele dorsal e pele ventral e dos adenômeros mucosos presentes na glândula dimórfica de *C. dubius*, *S. hiemalis* e *P. burmeisteri*.

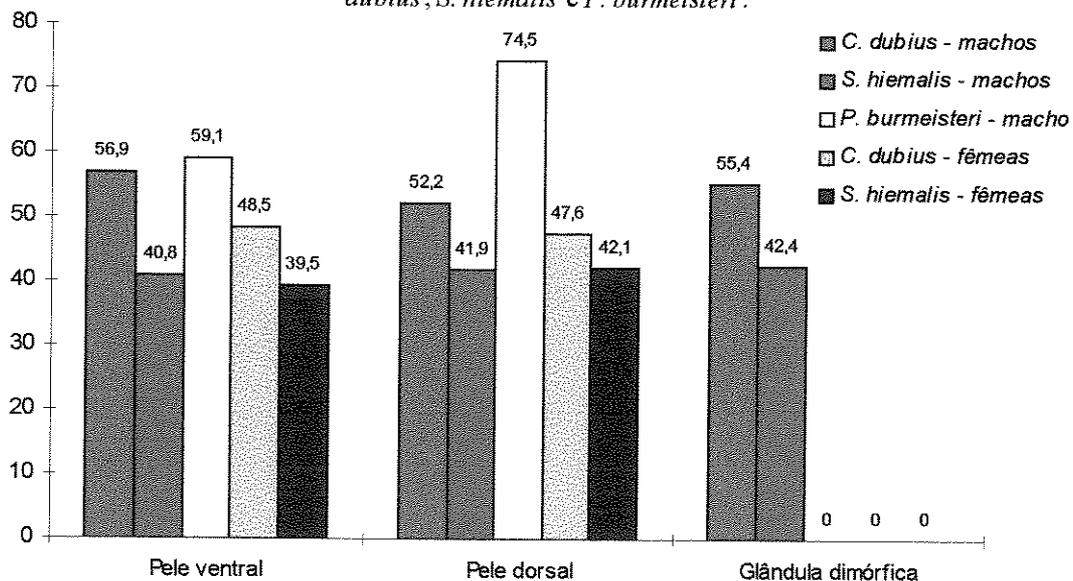


Gráfico 7. Diâmetro maior (μm) das glândulas granulosas presentes na pele dorsal e ventral e dos adenômeros granulosos presentes na glândula dimórfica de *C. dubius*, *S. hiemalis* e *P. burmeisteri*.

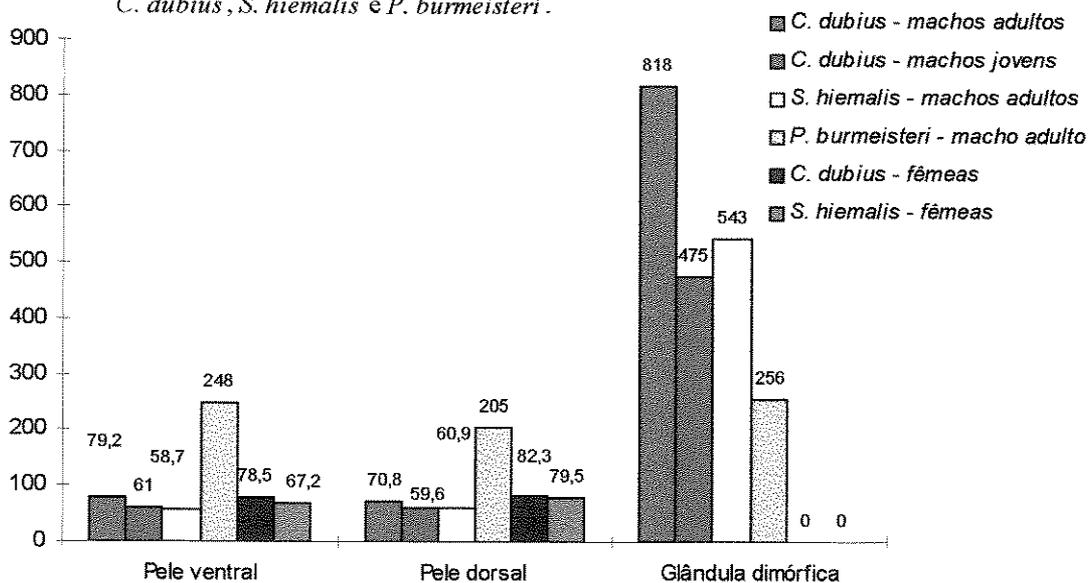


Gráfico 8. Diâmetro maior (μm) das glândulas lipídicas presentes na pele dorsal e ventral de *P. burmeisteri*

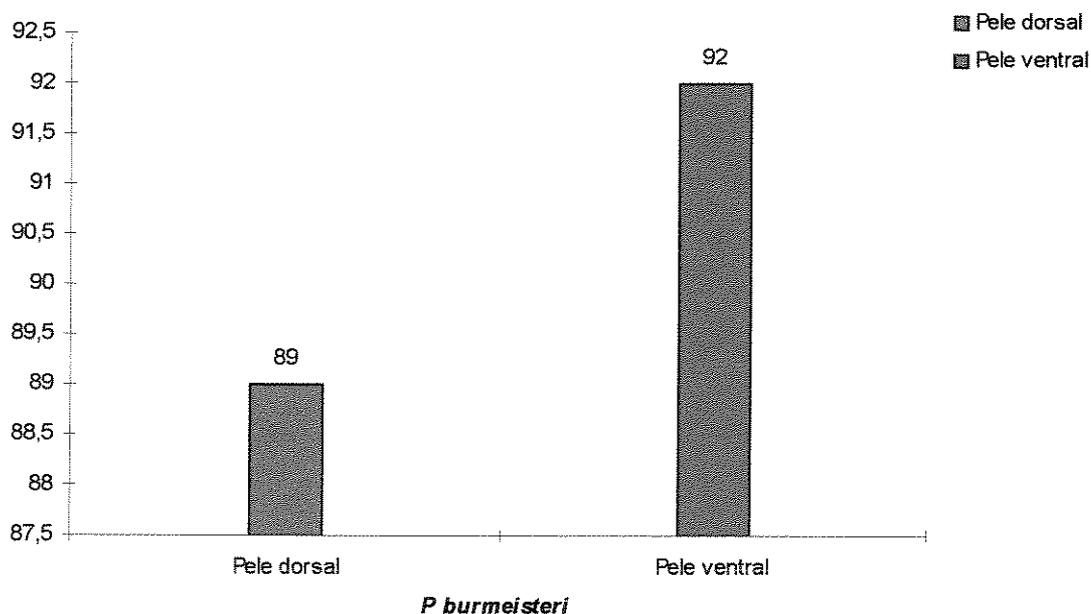


Gráfico 9. Espessura (μm) da pele dorsal de *C. dubius*

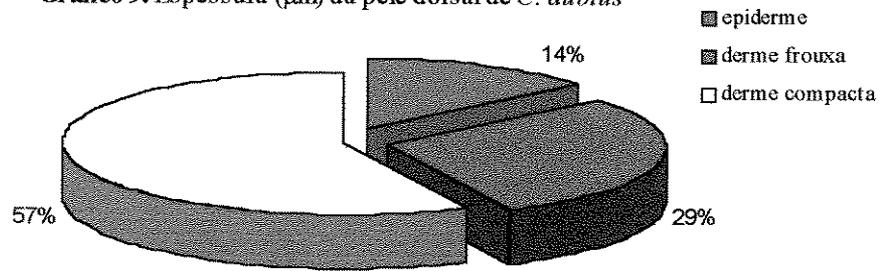


Gráfico 10. Espessura (μm) da pele dorsal de *P. burmeisteri*

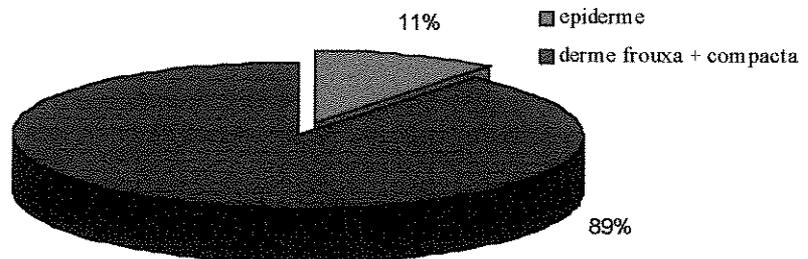


Gráfico 11. Espessura (μm) da pele dorsal de *S. hiemalis*

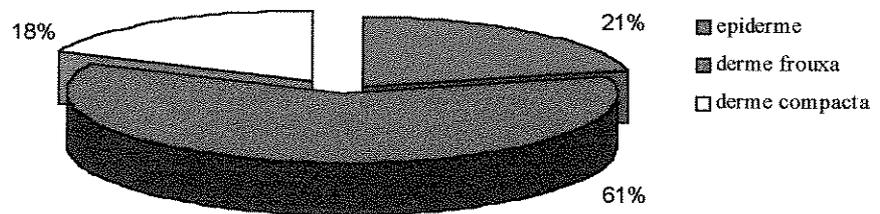


Gráfico 12. Espessura (μm) da pele dorsal e hipoderme de *C. dubius* (fêmeas)

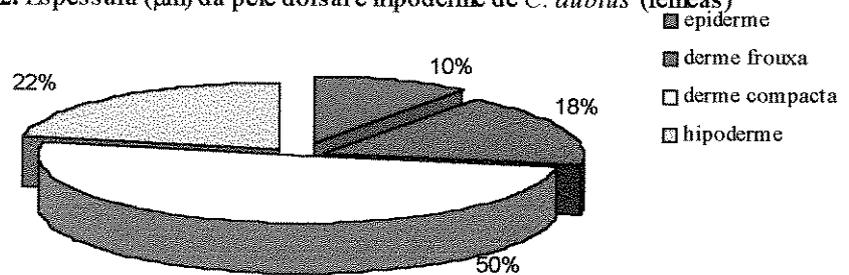


Gráfico 13. Espessura (μm) da pele dorsal e hipoderme de *S. hiemalis* (fêmeas)

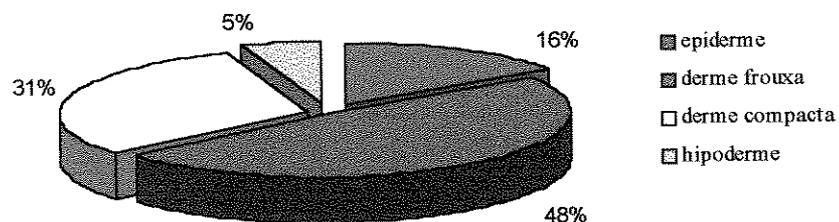


Gráfico 14. Espessura (μm) da pele ventral e hipoderme de *C. dubius*

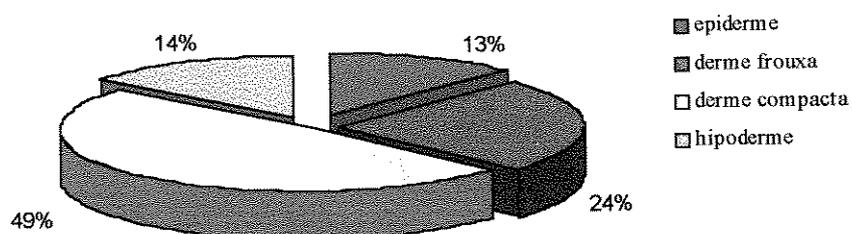


Gráfico 15. Espessura (μm) da pele ventral e hipoderme de *S. hiemalis*

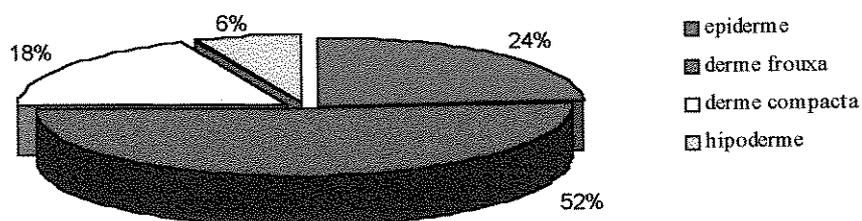


Gráfico 16. Espessura (μm) da pele ventral e hipoderme de *P. burmeisteri*

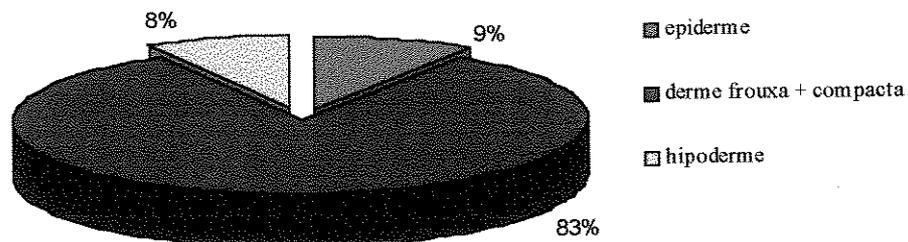


Gráfico 17. Espessura (μm) da pele ventral e hipoderme de *C. dubius* (fêmeas)

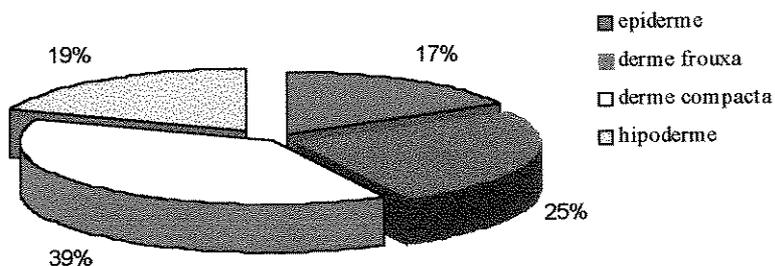


Gráfico 18. Espessura (μm) da pele ventral e hipoderme de *S. hiemalis* (fêmeas)

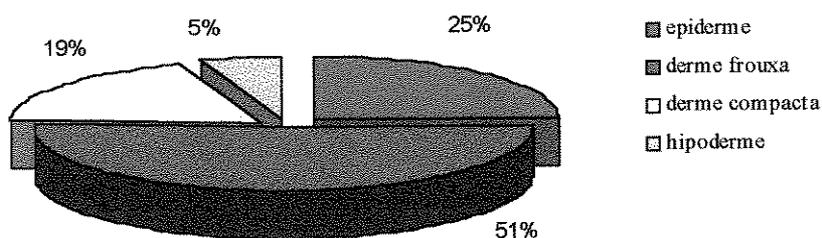


Gráfico 19. Espessura (μm) da região da glândula cutânea sexualmente dimórfica (epiderme, derme frouxa e compacta) e hipoderme de *C. dubius* (macho adulto)

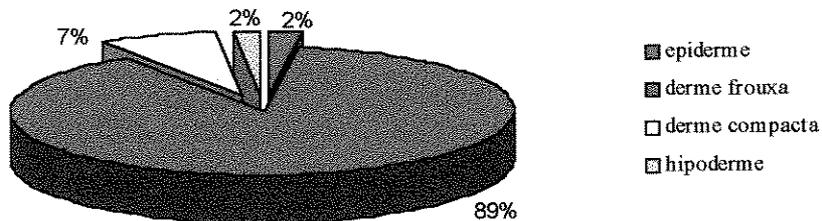


Gráfico 20. Espessura (μm) da região da glândula cutânea sexualmente dimórfica (epiderme, derme frouxa e compacta) e hipoderme de *C. dubius* (macho jovem)

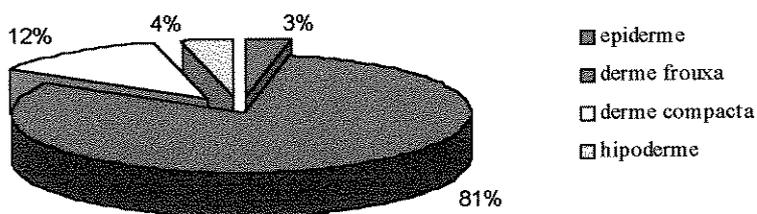


Gráfico 21. Espessura (μm) da região da glândula cutânea sexualmente dimórfica e hipoderme de *S. hiemalis* (machos adultos)

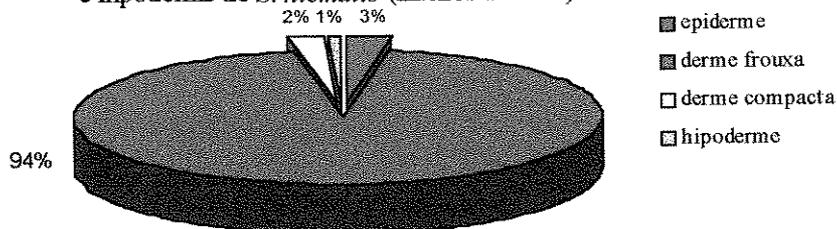


Gráfico 22. Espessura (μm) da região da glândula cutânea sexualmente dimórfica e hipoderme de *P. burmeisteri* (macho adulto)

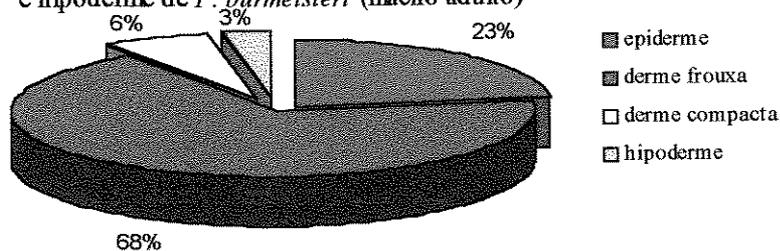


Gráfico 23. Diâmetro maior (μm) das glândulas mucosas presentes na pele e dos adenômeros mucosos presentes na glândula dimórfica (GCSD) de *C. dubius*

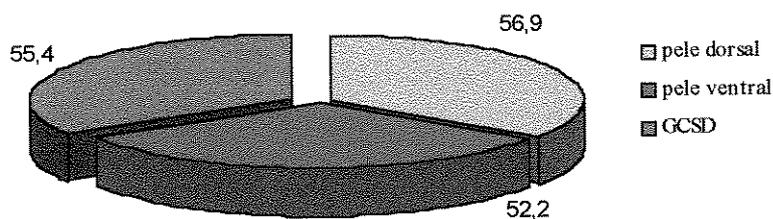


Gráfico 24. Diâmetro maior (μm) das glândulas mucosas presentes na pele e dos adenômeros mucosos presentes na glândula dimórfica (GCSD) de *S. hiemalis*

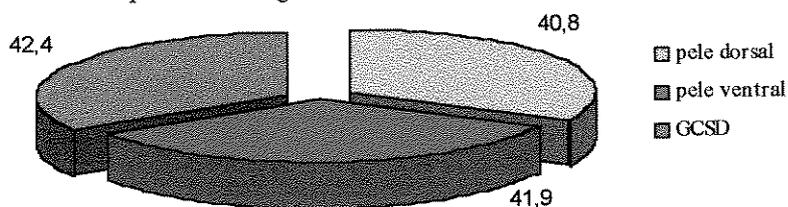


Gráfico 25. Diâmetro maior (μm) das glândulas mucosas presentes na pele dorsal e ventral de *P. burmeisteri*

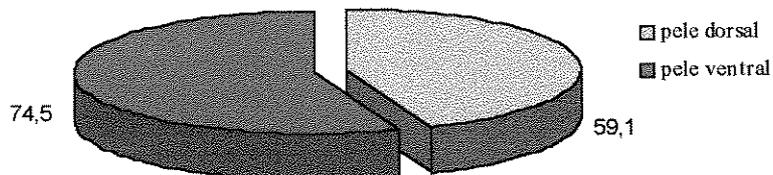


Gráfico 26. Diâmetro maior (μm) das glândulas mucosas presentes na pele dorsal e ventral de *C. dubius* (fêmeas)

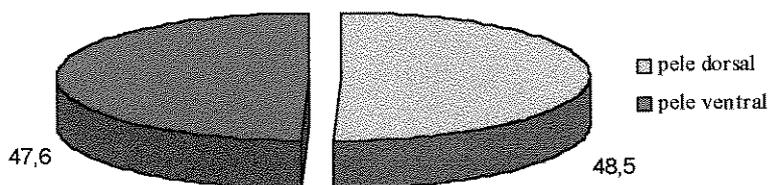


Gráfico 27. Diâmetro maior (μm) das glândulas mucosas presentes na pele dorsal e ventral de *S. hiemalis* (fêmeas)

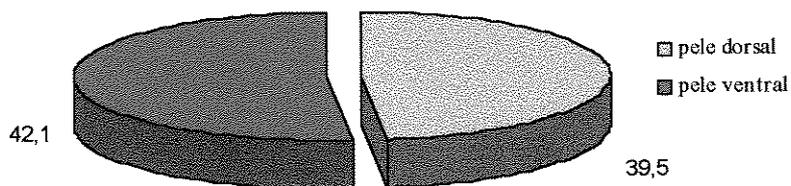


Gráfico 28. Diâmetro maior (μm) das glândulas mucosas presentes na pele e dos adenômeros granulados presentes na glândula dimórfica (GCSD) de *C. dubius* (machos adultos)

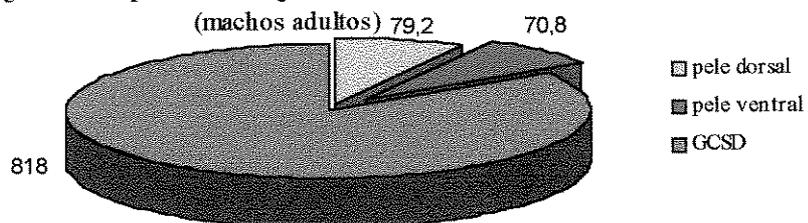


Gráfico 29. Diâmetro maior (μm) das glândulas granulosas presentes na pele e dos adenômeros granulosos presentes na GCSD de *C. dubius* (machos jovens)

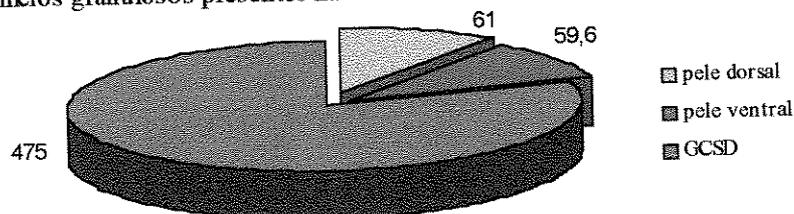


Gráfico 30. Diâmetro maior (μm) das glândulas granulosas presentes na pele e dos adenômeros granulosos presentes na GCSD de *S. hiemalis* (machos adultos)

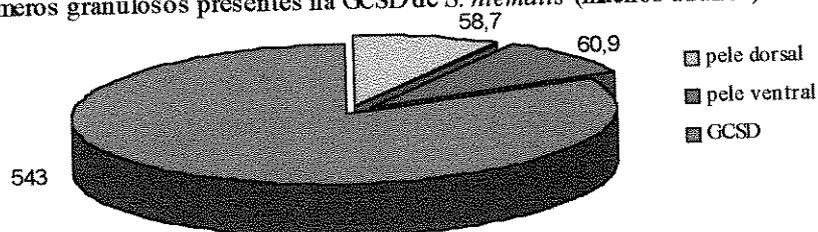


Gráfico 31. Diâmetro maior (μm) das glândulas granulosas presentes na pele e dos adenômeros granulosos presentes na GCSD de *P. burmeisteri* (macho adulto)

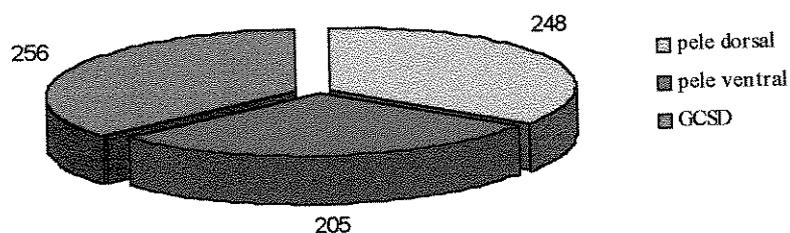


Gráfico 32. Diâmetro maior (μm) das glândulas granulosas presentes na pele dorsal e ventral de *C. dubius* (fêmeas)

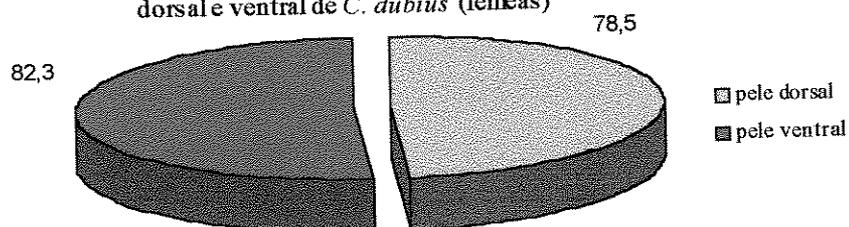


Gráfico 33. Diâmetro maior (μm) das glândulas granulosas presentes na pele dorsal e ventral de *S. hiemalis* (fêmeas)

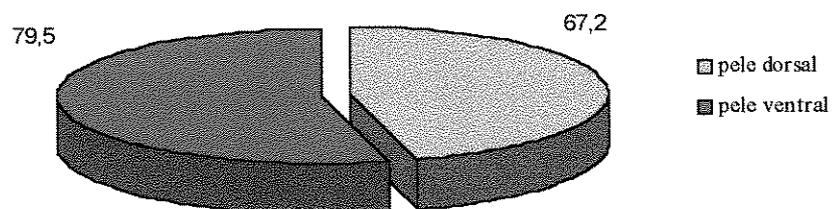
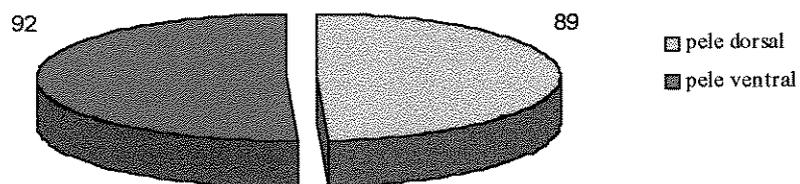


Gráfico 34. Diâmetro maior (μm) das glândulas lipídicas presentes na pele dorsal e ventral de *P. burmeisteri* (macho)



ABSTRACT

The skin, the cutaneous glands and the sexually dimorphic skin glands (SDSG) of the species *Cycloramphus dubius*, *Scinax hiemalis* and *Phyllomedusa burmeisteri* were comparatively studied by means of histological, histochemical and morphometric procedures. The focus of attention of this work was centered on the sexually dimorphic skin glands with the aim to establish not only the similarities among them but also to discuss the possible role played by this type of gland, since the SDSG are a distinctive secondary sexual character of adult males.

Our results show that the skin and the cutaneous glands of the three species investigated have the same basic histological organization, exhibiting, however, structural adaptations related with the ecological habitat and the habits of the animal.

The sexually dimorphic skin glands of the three species are very similar in their morphological and histochemical characteristics, although they have distinct anatomical localizations: inguinal region (for *C. dubius*), ventro-sacral region (for *S. hiemalis*) and in the thumbs (for *P. burmeisteri*); these glands are mainly clusters of granular glands, i.e., they are composed of elongated granular glands grouped compactly, covered by a thin epidermis. From these three glands, only the nuptial gland of *P. burmeisteri* can be considered as a breeding gland without question; for the other two glands additional work will be necessary to include them as glands related with the reproductive behavior of the animal. Nevertheless, field observations carried out for the species *C. dubius*, coupled with the morphology exhibited by the inguinal glands during the breeding season, strongly suggest that these glands may be involved in the reproductive activities of this species.

Key-words: integument, sexually dimorphic skin glands, histology, histochemistry, amphibia.

- CASTANHO, L.M., DE LUCA, I.M.S. Moulting behavior in leaf-frogs of the genus *Phyllomedusa*. **Zool Anz**, 1997, submetido à publicação.
- CEVIKBAS, A. Antibacterial activity in the skin secretion of the frog *Rana ridibunda*. **Toxicon**, v. 16, p.195-197, 1978.
- CHRISTENSEN, C.U. Adaptations in the water economy of some anuran amphibia. **Comp Biochem Physiol**, v. 47A, p.1035-1049, 1974.
- CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol Rev**, v.72, p.365-379, 1997.
- DALY, J.W., BROWN, G.B., MENSAH-DWUMAH, M., MYERS, C.W. Classification of skin alkaloids from neotropical poison-dart frogs (*Dendrobatidae*). **Toxicon**, v. 16, p.163-168, 1978.
- DAPSON, R.W. Histochemistry of mucus in the skin of the frog, *Rana pipiens*. **Anat Rec**, v.166, p.615-626, 1969.
- DAPSON, R.W., FELDMAN, A.T., WRIGHT, O.L. Histochemistry of granular (poison) secretion in the skin of the frog, *Rana pipiens*. **Anat Rec**, v.177, p.549-560, 1973.

DE LUCA, I.M.S.; GIARETTA, A.A.; ALBERTO-RINCON, M.C.; BECHARA, I.J.

Morphological study of the sexually dimorphic inguinal glands of *Cycloramphus dubius* (Amphibia, Anura, *Leptodactylidae*). **Braz J Morphol**, v.13, p.15-19, 1996.

DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill

Inc., 1986, 670p.

FUJIKURA, K., KURABUCHI, S., TABUCHI, M., INOUE, S. Morphology and

distribution of the skin glands in *Xenopus laevis* and their response to experimental estimulations. **Zoological Science**, v.5, p. 415-430, 1988.

GARTON, J.S., MUSHINSKY, H.R. Integumentary toxicity and unpalatability as a

defensive mechanism in *Gastrophryne carolinensis*. **Canadian J Zool**, v.57, p.1967-1973, 1979.

GIARETTA, A.A.; CARDOSO, A.J. Reproductive behavior of *Cycloramphus*

dubius Miranda-Ribeiro (Amphibia, Anura, *Leptodactylidae*). **Revta Bras Zool**, v.12, n.2, p.233-237, 1995.

HEATWOLE, H., BARTHALMUS, G.T., HEATWOLE, A.Y. The integument. **In:**

Amphibian Biology, Surrey Beatty, Chipping Norton, N.S.W., v.1, 1994.

HOSTETLER, J.R, CANNON, M.S. The anatomy of the parotoid gland in *Bufo* with some histochemical findings: I. *Bufo marinus*. **J Morphol**, v.142, p.225-240, 1974.

HOUCK, L.O. & SEVER, D.M.. The integument: a role of the skin in reproduction and behavior.. **In: Amphibian Biology**, Surrey Beatty, Chipping Norton, N.S.W., v.1, p.351-381, 1994.

HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. San Francisco, California, Freeman, 1962.

JUNQUEIRA, L.C.V., BIGNOLAS, G., BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. **Histochem J**, v.11, p.447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C. & JUNQUEIRA, L.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1^a ed., São Paulo, Livraria e Editora Santos, 1983. 123p.

KIERNAN, J.A. **Histological & histochemical methods**. Pergamon. 1st ed., London. 1990.

LILLYWHITE, H.B. & LICHT, P. A comparative study of integumentary mucous secretions in amphibians. **Comp Biochem Physiol**, v 51A, p.937-941, 1975.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 1ª ed., São Paulo, Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, 1980, 277p.

NOBLE, G.K. **The biology of the amphibia**. New York, Dover Publications, 1955, 577p.

SCHUMACHER, U., ADAM, E., HAUSER, F., PROBST, J.C., HOFFMANN, W. Molecular anatomy of a skin gland: histochemical and biochemical investigations on the mucous glands of *Xenopus laevis*. **J Histochem Cytochem**, v.42, n.1, p.57-65, 1994.

SEVER, D.M. Caudal hedonic glands in salamanders of the *Eurycea bislineata* complex. **Herpetologica**, v.45, p.322-329, 1989.

SPICER, S.S. & LILLIE, R.D. Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. **J Histochem Cytochem**, v.7, p.123-125, 1959.

THOMAS, E.O. & LICHT, P. Testicular and androgen dependence of skin gland morphology in the anurans, *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. **J Morphol**, v.215, p.195-200, 1993a.

THOMAS, E.O., TSANG, L., LICHT, P. Comparative histochemistry of the sexually dimorphic skin glands of anuran amphibians. **Copeia**, v.1, p.133-143, 1993b.

TOLEDO, R.C., JARED, C. Estudo histológico das glândulas lombares de *Pleurodema thaul* (Amphibia, Amura, Leptodactylidae). **Rev Bras Biol**, v.49, n.2, p.421-428, 1989.

TOLEDO, R.C. & JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp Biochem Physiol**, v.111A, p.1-29, 1995.